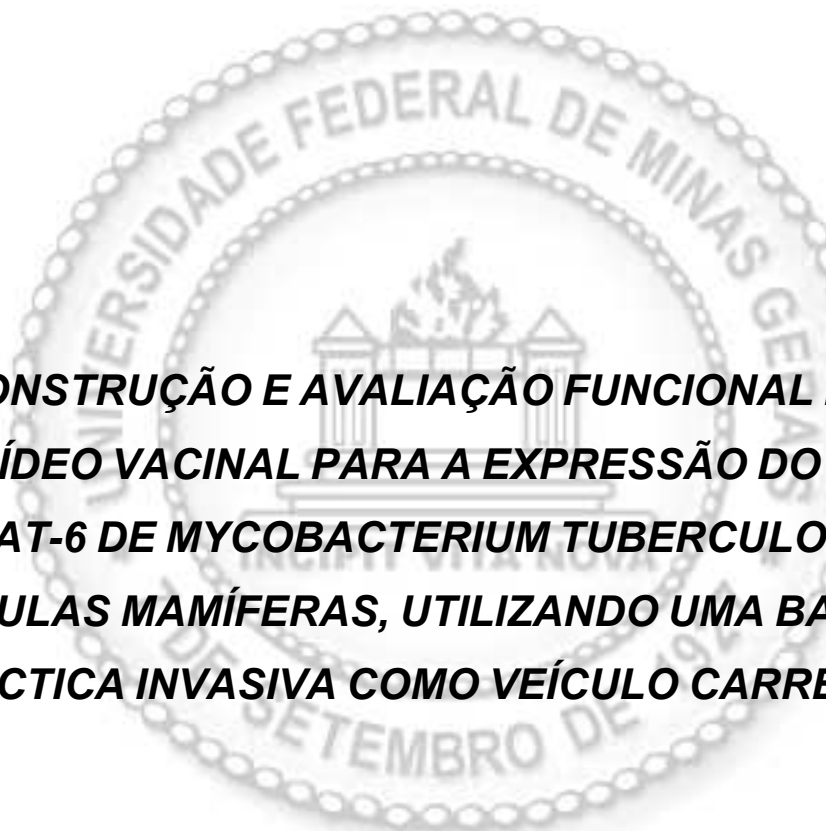


DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



***CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM
PLASMÍDEO VACINAL PARA A EXPRESSÃO DO ANTÍGENO
ESAT-6 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM
CÉLULAS MAMÍFERAS, UTILIZANDO UMA BACTÉRIA
LÁCTICA INVASIVA COMO VEÍCULO CARREADOR***

ORIENTADA: VANESSA BASTOS PEREIRA

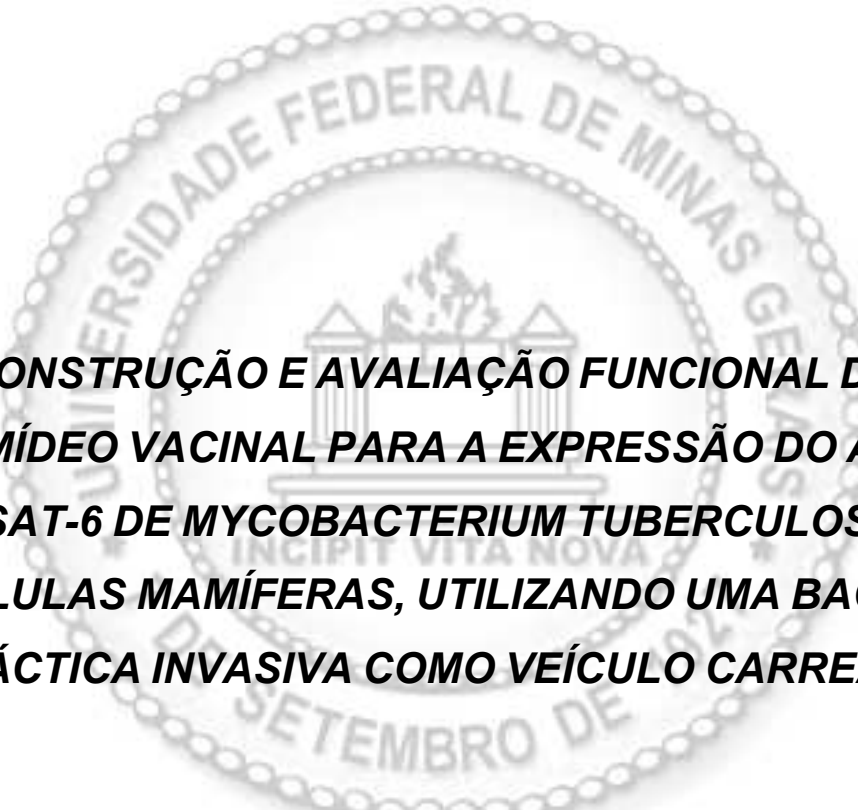
ORIENTADOR: PROF. DR. ANDERSON MIYOSHI

CO-ORIENTADORA: DRA. SOPHIE LECLERCQ

BELO HORIZONTE – MG

FEVEREIRO - 2011

VANESSA BASTOS PEREIRA



**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE UM
PLASMÍDEO VACINAL PARA A EXPRESSÃO DO ANTÍGENO
ESAT-6 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EM
CÉLULAS MAMÍFERAS, UTILIZANDO UMA BACTÉRIA
LÁCTICA INVASIVA COMO VEÍCULO CARREADOR**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDERSON MIYOSHI

CO-ORIENTADORA: DRA. SOPHIE LECLERCQ

BELO HORIZONTE – MG

FEVEREIRO – 2011

*“Depois de algum tempo, você aprende...
Que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser;
Que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto;
Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo;
E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito
mais longe depois de pensar que não se pode mais.
E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!”
(William Shakespeare)*

AGRADECIMENTOS

Prof. **Dr. Anderson Miyoshi** pela grande oportunidade, orientação e confiança depositada em mim. Muito obrigada!

Prof. **Dr. Vasco Azevedo** pelo apoio, incansável motivação e pela confiança.

A Pesquisadora **Dra. Sophie Leclercq** pela co-orientação e apoio.

Ao Professor **Dr. Dawidson Assis Gomes** pelas importantes recomendações e discussões

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

À coordenação, professores e colegas do curso de **Pós-Graduação em Genética** do ICB-UFMG.

Aos amigos do **LGCM** que fizeram cada dia de trabalho mais especial: Fernanda Dorella, Thiago, Siomar, Sarah, Fernanda Lima, Kátia, Cássio, Luís, Núbia, Aracele, Marina, Clarissa, Meryxtell, Fernanda Militão, Camila Prósperi, Fernanda Magalhães, Bianca, Alfonso, Vívian, Dayane, Síntia, Rodrigo, Camila Azevedo, Vinícius, Aryane, Anderson Santos, Pablo, Vanessa Pfeifer, Eudes, Amijad, Alessandro, Islam.

Em especial aos **amigos** Wanderson, Tessália, Flávia, Caroline e Anne, que estiveram sempre presentes, tornando mais importante cada dia de trabalho.

As **amigas** Janete, Pamela e Naira, pelo imenso apoio e dedicação, especialmente nos experimentos finais de minha dissertação.

Aos amigos da **FUNED**, que me apoiaram e me deram grande força.

Aos meus **Pais** pelo amor e dedicação, de longe sempre torcendo e incentivando. A minha mãe pelo carinho e ao meu pai pela compreensão e conselhos para toda vida. Ao meu irmão pela alegria de sempre.

A todos os meus **Amigos e Familiares** que sempre estiveram perto, dando força, apoio e muitas alegrias a cada dia que se passou durante o meu mestrado.

Ao meu marido **Leonardo** pelo amor, companheirismo e alegria de viver. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV

RESUMO.....	1
I. APRESENTAÇÃO.....	3
1.1 Colaborações.....	4
1.2 Introdução Geral.....	5
1.3 Estrutura da dissertação.....	8
II. INTRODUÇÃO.....	9
II.1 Vacinas de DNA.....	10
II.1.1 Histórico das Vacinas de DNA.....	10
II.1.2 Vantagens das vacinas de DNA.....	11
II.1.3 Vacinas de DNA aprovadas e em ensaios clínicos.....	13
II.1.4 Estruturas dos vetores para vacinas de DNA.....	13
II.1.5 Otimização da imunogenicidade na construção de vacinas de DNA.....	15
II.1.6 Mecanismo de ação das vacinas de DNA.....	18
II.1.7 Barreiras para transferência gênica.....	21
II.1.8 Vias de entrega das vacinas de DNA.....	21
II.1.9 Bactérias na entrega de vacinas de DNA.....	23
II.1.9.1 Aspectos imunológicos.....	24
II.1.9.2 Bactérias patogênicas utilizadas para a entrega de vacinas de DNA.....	25
II.2 Bactérias Lácticas.....	26
II.2.1 Características das Bactérias Lácticas.....	26
II.2.2 Lactococcus lactis: a bactéria láctica modelo.....	27
II.2.3 Utilizações biotecnológicas de Lactococcus lactis.....	27
II.2.3.1 Produção de proteínas em Lactococcus lactis.....	28
II.2.3.2 Lactococcus lactis como vacinas vivas de mucosas.....	29
II.2.3.3 Lactococcus lactis como carreador para vacinas gênicas.....	30
II.3 Tuberculose.....	32
II.3.1 Considerações gerais.....	32

II.3.2 Vacinas contra a tuberculose.....	33
II.3.3 A família ESAT-6.....	34
II.3.4 ESAT-6 como um antígeno vacinal.....	35
II.3.4.1 Vacinas em desenvolvimento utilizando ESAT-6.....	35
III. OBJETIVOS	38
III.1 Objetivo Geral	39
III. 2 Objetivos específicos.....	39
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
IV.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem	41
IV.2 Manipulação do DNA	44
IV.3 Resolução Eletroforética	44
IV.4 Amplificação da ORF ESAT-6.....	45
IV.5 Clonagem da ORF ESAT-6 no sistema TOPO.....	46
IV.5.1 Confeção de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente	46
IV.5.2 Transformação de <i>Escherichia coli</i> TOP10	47
IV.5.3 Extração do DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i> TOP10.....	48
IV.5.4 Confirmação da presença e do tamanho do inserto ESAT-6 no plasmídeo Zero Blunt® TOPO®.....	50
IV.5.5 Reação de sequenciamento e análises em sílico	50
IV.6 Subclonagem da ORF ESAT-6 no plasmídeo pValac	51
IV.6.1 Extração do plasmídeo pValac:gfp.....	51
IV.6.2 Digestão enzimática do plasmídeo pValac:gfp	51
IV.6.3 Purificação do fragmento de DNA do plasmídeo pValac digerido.....	52
IV.6.4 Digestão enzimática do plasmídeo pTP:ESAT-6 e purificação do fragmento de DNA ESAT-6	53
IV.6.5 Ligação da ORF ESAT-6 no vetor pValac	53
IV.6.6 Transformação de <i>Escherichia coli</i> TG1 com o plasmídeo pValac:ESAT-6.....	54
IV.6.7 Confirmação da presença e tamanho do inserto ESAT-6 no vetor pValac	54
IV.6.8 Reação de sequenciamento e análises em sílico	55
IV.7 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 em cultura de células mamíferas	56
IV.7.1 Cultura de Células CHO (Chinese hamster ovary)	56
IV.7.2 Transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac:ESAT-6.....	57
IV.7.2.1 Obtenção do DNA para Transfecção.....	57
IV.7.2.2 Padronização da transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac:gfp... 57	
IV.7.3 Verificação da expressão de ESAT-6 em células mamíferas por RT-PCR.....	58
IV.7.3.1 Extração do RNA total das células transfectadas.....	58

IV.7.3.2 RT-PCR para a verificação da expressão de ESAT-6 em células CHO.....	59
IV.7.4 Verificação da produção de ESAT-6 por Western Blotting	60
IV.7.4.1 Extração de proteínas das células transfectadas	60
IV.7.4.2 Resolução eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante	61
IV.7.4.3 Visualização dos extratos protéicos pelo método de Nitrato de Prata.....	62
IV.7.4.4 Western Blotting.....	62
IV.7.5 Verificação da produção de ESAT-6 por Imunocitoquímica.....	63
IV.7.5.1 Visualização da proteína ESAT-6 através da marcação com Fitc.....	63
IV.7.5.2 Visualização da proteína ESAT-6 através da marcação com Alexa 488.....	64
IV.8 Transformação de <i>L. lactis</i> FnBPA com pValac:ESAT-6	65
IV.8.1 Confecção de células eletrocompetentes de <i>L. lactis</i> FnBPA	65
IV.8.2 Transformação de <i>L. lactis</i> FnBPA com o plasmídeo pValac:ESAT-6	66
IV.8.3 Extração do DNA plasmidiano de <i>L. lactis</i> FnBPA(pValac:ESAT-6)	67
IV.8.4 Confirmação dos clones <i>L. lactis</i> FnBPA portadores do plasmídeo pValac:ESAT- 6.....	67
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
V.1 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor pValac	71
V.1.1 Amplificação da ORF ESAT-6	71
V.1.2 Clonagem da ORF ESAT-6 no sistema TOPO	72
V.1.2.1 Confirmação da integridade da seqüência nucleotídica da ORF ESAT-6 clonada no vetor Zero Blunt TOPO através da técnica de sequenciamento e análises <i>in sílico</i> .	74
V.1.3 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor pValac	75
V.1.3.1 Reação de sequenciamento e análises <i>in sílico</i>	78
V.2 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 em cultura de células... 80	
V.2.1 Padronização da Transfecção Celular com o plasmídeo pValac	80
V.2.2 Verificação da expressão de ESAT-6 por RT-PCR	81
V.2.3 Verificação da produção de ESAT-6 por Western Blotting	83
V.2.4 Verificação da produção de ESAT-6 por Imunocitoquímica.....	84
V.2.4.1 Marcação com Fitc.....	84
V.2.4.2 Marcação com Alexa 488.....	85
V.3 Construção da linhagem FnBPA de <i>L. lactis</i> contendo o plasmídeo pValac:ESAT-6 . 87	
V.3.1 Obtenção das linhagens invasivas <i>L. lactis</i> pValac:ESAT-6 e <i>L. lactis</i> pValac:gfp	87
VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	89
VI.1 Conclusões.....	90
VI.2 Perspectivas	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM PLASMÍDEO PARA USO COMO VACINA DE DNA.....	14
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA INDUÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR E HUMORAL POR VACINAS DE DNA.....	20
FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA TRANSFERÊNCIA DE DNA DE UMA BACTÉRIA INVASIVA ATENUADA PARA UMA CÉLULA EUCARIÓTICA.....	23
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DO VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA PVALAC (VACCINATION USING LACTIC ACID BACTERIA).....	43
FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VETOR ZERO BLUNT® TOPO®, DESTACANDO-SE O SÍTIO DE CLONAGEM MÚLTIPLA DO MESMO.....	48
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA PVALAC:GFP.....	52
FIGURA 7: ANÁLISE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA ORF ESAT-6 DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> E PURIFICAÇÃO.....	72
FIGURA 8: AMPLIFICAÇÃO POR PCR DA ORF ESAT-6 DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> E DIGESTÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DO DNA PLASMIDIANO EXTRAÍDO DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO PTP:ESAT-6.	74
FIGURA 9: SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO INSERTO CONTIDO NO VETOR ZERO BLUNT® TOPO®, UTILIZANDO OS PRIMERS M13.....	75
FIGURA 10: ANÁLISE DO PRODUTO DA EXTRAÇÃO PLASMIDIANA, DIGESTÃO DO PVALAC:GFP E PURIFICAÇÃO DO VETOR PVALAC.....	76
FIGURA 11: DIGESTÃO ENZIMÁTICA DO PLASMÍDEO PTP:ESAT-6 COM AS ENZIMAS <i>BAMHI</i> E <i>ECORI</i> E PURIFICAÇÃO DA ORF ESAT-6.....	77

FIGURA 12: CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DA ORF ESAT-6 NO VETOR PVALAC POR DIGESTÃO ENZIMÁTICA E PCR.....	78
FIGURA 13: SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA OBTIDA ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DO INSERTO CONTIDO NO VETOR PVALAC.....	79
FIGURA 14: RESULTADO DA PADRONIZAÇÃO DA TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS FLP-IN TM -CHO (INVITROGEN) COM O PLASMÍDEO PVALAC: <i>GFP</i>	81
FIGURA 15: PRODUTOS DE PCR OBTIDOS A PARTIR DOS cDNAs CONVERTIDOS OU NÃO DO RNA TOTAL EXTRAÍDO DE CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS COM O PLASMÍDEO PVALAC: <i>ESAT-6</i>	82
FIGURA 16: WESTERN BLOTTING REALIZADO A PARTIR DO EXTRATO PROTÉICO DE CÉLULAS CHO TRANSFECTADAS COM O PLASMÍDEO PVALAC: <i>ESAT-6</i>	84
FIGURA 17: VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESAT-6 EM CÉLULAS TRANSFECTADAS PELO PLASMÍDEO PVALAC: <i>ESAT-6</i> POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	85
FIGURA 18: VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESAT-6 POR IMUNOCITOQUÍMICA UTILIZANDO-SE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	86
FIGURA 19: CONFIRMAÇÃO DAS TRANSFORMAÇÕES DE <i>L. LACTIS</i> FNBPA COM O PLASMÍDEO PVALAC: <i>ESAT-6</i> OU PVALAC: <i>GFP</i>	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: VANTAGENS NA UTILIZAÇÃO DAS VACINAS DE DNA.....	12
TABELA 2: LINHAGENS BACTERIANAS.....	42
TABELA 3: PLASMÍDEOS UTILIZADOS.....	43
TABELA 4: PRIMERS UTILIZADOS NA PCR DA ORF ESAT-6.....	46
TABELA 5: PRIMERS UTILIZADOS NA PCR DA ORF ESAT-6, <i>GFP</i> E DE PARTE DA ORF FNBPA...	69

LISTA DE ABREVIATURAS

aa – Aminoácidos
Amp - Ampicilina
APC - Células Apresentadoras de Antígenos
BCG - Bacillus Calmette-Guérin
BCR - Receptor de Célula B
BHI - “Brain Heart Infusion”
BL - Bactérias lácticas
BLG - β -Lactoglobulina Bovina
BSA - “Bovine Serum Albumin”
cDNA - DNA complementar
CFP-10 - “10-kDa Culture Filtrate Protein”
CHO - “Chinese Hamster Ovary”
Cm - Clorafenicol
CMV - Citomegalovirus
Cm - Clorafenicol
CpG - Citosina-fosfato-Guanina
DC - Células Dendríticas
DEPC - Dietil pirocarbonato
ECANS - “Epitopes Casted in a Natural Structure”
EDTA - Etileno diamino tetra-acetato dissódio
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato
GFP - “Green Fluorescent Protein”
ELISPOT - “Enzyme-Linked Immunosorbent Spot”
ERY - Eritromicina
ESAT-6 - “6-kDa Early Secreted Antigenic Target”
ESX-1 - Sistema de Secreção 1 de ESAT-6
FACS - “Fluorescent Activated Cell Sorter”
FnBPA - Proteína de ligação Fibronectina A
GAPDH - Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase
GRAS - “Generally Regarded As Safe”
HCl - Ácido clorídrico
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IgA - Imunoglobulina A

IL - Interleucina
InIA - Internalina A
INRA - Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (França)
Kb - Quilobases (10^3 pb)
KCl - Cloreto de potássio
KDa - Quilodaltons (10^3 Da)
Km - Canamicina
LB - Luria-Bertani
L - Litro
 μ g - Micrograma
LPS - lipopolissacáridos
 μ F - Microfarad (capacitância)
 μ L - Microlitro
 μ M - Micromolar
M - Molar
mA - Miliampere (Amperagem)
MDR-TB - Linhagens de *M. tuberculosis* Multidrogas Resistentes
MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade
M17-Sac-Gli - M17 Sacarose Glicose
mg - Miligrama
 $MgCl_2$ - Cloreto de magnésio
mL - Mililitro
mM - Milimolar
mRNA - RNA mensageiro
NaCl - Cloreto de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
ng - Nanogramas
NICE - “Nisin Controlled Expression System”
NK - “Natural Killer”
ORF - Open Read Frame
PAMPs - Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PEG3000 – “Polyethylene glycol 3000”
PBS - “Phosphate Buffered Saline”
pCMV - Promotor do citomegalovírus
PCR - “Polymerase Chain Reaction”
PSA - Persulfato de Amônio
pSV40 - Promotor do símio vírus 40

pRSV - Promotor do Rous vírus
q.s.p. - Quantidade Suficiente para
RD1 - Região de Diferença 1
RNA - Ácido ribonucléico
Rnase - Ribonuclease A
rpm - Rotações por Minuto
rRNA - RNA ribossômico
RT-PCR - Transcriptase Reversa PCR
SDS-PAGE - “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
SV40 - simian virus 40
TB - Tuberculose
TCR - Receptor de Célula T
TE-LYS - Tris-EDTA-Lisozima
TEMED - N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethane
Tris - Tris-hidroximetilaminometano
TTFC - Fragmento C da Toxina Tetânica
V - Volts
XIES - “Xylose-Inducible Expression System”
XDR-TB - Linhagens de *M. tuberculosis* Extensivamente Droga-resistentes
W - Wats
 Ω - Ohm (resistência)

RESUMO

O uso de bactérias como veículos para a entrega de plasmídeos vacinais pela rota oral constitui uma estratégia de vacinação promissora contra diversas doenças infecciosas. Para isto, bactérias patogênicas atenuadas como *Shigella*, *Listeria* e *Salmonella* vêm sendo utilizadas, ainda que as mesmas apresentem risco de reversão ao seu fenótipo selvagem. Sendo assim, a utilização de bactérias não patogênicas poderia constituir uma alternativa mais segura para este propósito. *Lactococcus lactis* é uma bactéria láctica modelo considerada GRAS (“Generally Recognized As Safe”) que vem sendo extensivamente utilizada para a produção e entrega de antígenos e citocinas ao nível de mucosas. Assim, *L. lactis* pode representar uma alternativa para a entrega de plasmídeos vacinais em relação aos patógenos atenuados, ainda que o mesmo não tenha capacidade invasiva. Neste contexto, foram construídas linhagens de *L. lactis* invasivas (*L. lactis* FnBPA, Innocentin *et al.*, 2009) e também um plasmídeo replicativo em *L. lactis*, contendo um cassete de expressão eucariótica (pValac, Guimarães *et al.*, 2009). Assim, a utilização de uma linhagem invasiva de *L. lactis* contendo o vetor pValac para a expressão eucariótica do antígeno ESAT-6 (“6-kDa Early Secreted Antigenic Target”) de *Mycobacterium tuberculosis*, pode vir a ser uma nova estratégia para o controle da tuberculose; uma doença infecto-contagiosa que atinge 1/3 da população mundial na forma latente. Desta forma, este trabalho teve como objetivo a construção do plasmídeo vacinal pValac:ESAT-6 e verificação de sua funcionalidade, *in vitro*, assim como a clonagem na linhagem invasiva de *L. lactis* para sua utilização como uma via de entrega oral de vacinas gênicas. A seqüência codificadora de ESAT-6 foi isolada por PCR a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* linhagem H37Rv para clonagem no vetor Zero Blunt® TOPO® e posteriormente no vetor pValac. A construção final, pValac:ESAT-6, foi primeiramente obtida em *Escherichia coli* TG1. Para a avaliação da funcionalidade do plasmídeo, células da linhagem CHO (“Chinese Hamster Ovary”) foram transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 e a expressão de ESAT-6 foi avaliada por RT-PCR, *Western blotting* e Imunocitoquímica, sendo, a funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6, assim confirmada. Por fim, o plasmídeo pValac:ESAT-6 foi transformado na linhagem invasiva de *L. lactis*, gerando a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). Enfim, este trabalho constitui um primeiro passo rumo à validação da eficácia e efetividade de novas vacinas gênicas baseadas em bactérias lácticas geneticamente modificadas, por via de administração oral em mucosas; o que também poderá fornecer informações valiosas para a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas contra outros patógenos.

ABSTRACT

The use of bacteria as vehicles for the delivery of vaccine plasmids by oral route constitutes a promising strategy for vaccination against various infectious diseases. Attenuated pathogenic bacteria such as *Shigella*, *Listeria* and *Salmonella* have been widely used for such purposes, although presenting potential risk to revert into their wild-type phenotype. In this regard, the use of non-pathogenic bacteria, such as lactic acid bacteria (LAB), constitutes a more attractive and safe alternative. *Lactococcus lactis*, which belongs to the LAB group, obtained the GRAS (Generally Recognized As Safe) status due to their lack of pathogenicity and has been extensively used for the production and delivery of antigens and cytokines to the mucosal level. As such, *L. lactis* represents an alternative to attenuated pathogenic bacteria for the delivery of vaccine plasmids although not having invasive capacity; hence, invasive *L. lactis* strains (*L. lactis* FnBPA, Innocentin *et al.*, 2009) as well as a plasmid that replicates in *L. lactis* and contains a eukaryotic expression cassette (pValac, Guimarães *et al.*, 2009) were constructed. It is therefore believed that the use of invasive *L. lactis* containing the pValac vector, for eukaryotic expression of the ESAT-6 antigen (6-kDa Early Secreted Antigenic Target) of *Mycobacterium tuberculosis*, could represent a new strategy for controlling Tuberculosis, an infectious disease that affects, in latent form, 1/3 of the worlds population. Thus, the goal of this project was to construct the plasmid vaccine pValac:ESAT-6, verify its functionality *in vitro*, its cloning capacity into the invasive strain of *L. lactis* and its use as delivery vehicle of an oral DNA vaccine. For this purpose, the coding sequence of ESAT-6 was isolated by PCR from the genomic DNA of *M. tuberculosis* strain H37Rv, cloned into the vector Zero Blunt® TOPO® and subsequently into pValac. The final construct pValac:ESAT-6 was first obtained in *Escherichia coli* TG1. In order to evaluate the functionality of the plasmid, CHO (Chinese Hamster Ovary) cell lines were transfected with the plasmid pValac:ESAT-6 and the ESAT-6 expression evaluated by RT-PCR, Western blotting and immunocytochemistry; in doing so, the functionality of the pValac:ESAT-6 plasmid was confirmed. Finally, the plasmid pValac:ESAT-6 was transformed into the invasive strain of *L. lactis* generating the strain *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6). This work constitutes a first step towards validation of the efficiency and effectiveness of a new genetic vaccine based on genetically modified LAB and oral administration through mucous membranes, which may provide valuable information for research and for the development of vaccines against other pathogens.

I. APRESENTAÇÃO

I. APRESENTAÇÃO

I.1 Colaborações

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma colaboração entre o Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e o Laboratório de Inovação Biotecnológica (LIB) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Esta colaboração se deu devido ao interesse mútuo dos laboratórios, acima citados, em promover o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e terapêuticas para as bactérias lácticas. Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Professor Doutor Anderson Miyoshi (LGCM – UFMG) e a co-orientação da Doutora Sophie Leclercq (LIB – FUNED), e contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

I.2 Introdução Geral

Diversos agentes infecciosos invadem o hospedeiro através da superfície de mucosas para causar doenças, sendo que a microbiota do trato gastrointestinal atua como um estímulo primário para a ativação do sistema imune de mucosas (Deplancke e Gaskins, 2002; Macfarlane e Cummings, 2002). Assim, o uso de bactérias como veículo para a entrega de plasmídeos vacinais pela rota oral constitui uma estratégia de vacinação promissora contra um largo espectro de doenças infecciosas (Schoen *et al.*, 2004). Bactérias patogênicas atenuadas tais como *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium têm sido utilizadas para a entrega de vetores de expressão eucariótica em células de mamíferos (Daudel *et al.*, 2007). Após essas bactérias invadirem as células epiteliais e serem fagocitadas, o plasmídeo consegue escapar da vesícula podendo, assim, alcançar o núcleo da célula hospedeira, resultando na expressão da ORF (“Open Read Frame”) de interesse e posterior apresentação antigênica (Grillot-Courvalin *et al.*, 1999). Contudo, esses organismos apresentam riscos de reversão ao seu fenótipo selvagem, ou seja, podem voltar a ser patogênicos, não sendo assim totalmente seguros para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Tal situação poderia ser contornada pela utilização de bactérias não patogênicas.

Neste contexto, o uso de Bactérias Lácticas (BL) como veículo para a entrega de plasmídeos vacinais representaria uma alternativa atrativa em relação à patógenos atenuados (Wells e Mercenier, 2008). As BL constituem um diverso grupo de microrganismos Gram-positivos capazes de converter açúcares em ácido láctico. Dentre os representantes deste grupo de bactérias, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como um microrganismo modelo no estudo das mesmas; não só pela sua importância econômica, como na indústria de laticínios, mas também devido ao fato de ser um microrganismo de fácil manipulação, ser considerada segura (“GRAS” - “Generally Recognized As Safe”), ter o seu genoma completamente seqüenciado e possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Azevedo e Miyoshi, 2004; Bahey-El-Din e Gahan, 2010a). Moléculas heterólogas de interesse biotecnológico vêm sendo intensamente produzidas em *L. lactis* (Wells e Mercenier, 2008). Dessa maneira, o uso de *L. lactis* como um veículo para a entrega de plasmídeos vacinais é bastante promissor.

Para isto, uma linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína de ligação Fibronectina A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi construída e testada com o objetivo de melhorar e facilitar a entrega do DNA à células de mamíferos

(Innocentin *et al.*, 2009). FnBPA medeia a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000). Foi demonstrado que *L. lactis* expressando FnBPA foi capaz de entregar um plasmídeo de expressão eucariótica funcional à linhagem celular Caco-2 (Innocentin *et al.*, 2009). Além disso, um novo plasmídeo, chamado pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria), de 3.742 pb foi construído. O pValac foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovírus (pCMV) que permite a expressão do antígeno em células eucarióticas, (ii) sítio de clonagem múltipla, (iii) seqüência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A) para estabilizar o transcrito de RNA mensageiro, (iii) origens de replicação que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *Escherichia coli* quanto em *L. lactis*, e (iv) um gene de resistência ao cloranfenicol para a seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Desta forma, a utilização de linhagens de *L. lactis* invasivas para a entrega do vetor de expressão eucariótica pValac expressando um antígeno de interesse poderia representar uma nova estratégia para o controle de doenças infecciosas, como, por exemplo, a tuberculose.

A Tuberculose (TB), causada por *Mycobacterium tuberculosis*, é uma doença infecto-contagiosa que atinge um terço da população mundial na sua forma latente, fato que torna esta doença um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (Lugo e Bewley, 2008). O tratamento da TB consiste na administração de múltiplos antibióticos durante um período de tempo prolongado, que geralmente não é seguido pelos pacientes, contribuindo para o surgimento de linhagens multidrogas resistentes, tornando esta medida pouco eficaz. Além da quimioterapia convencional, a doença pode ser controlada utilizando-se a BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*), única vacina disponível para uso clínico. Verificou-se que esta vacina é capaz de proteger crianças contra as formas mais severas da TB (Trunz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Entretanto, embora que a BCG venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da mesma permanece controversa. A eficácia da vacina contra a TB pulmonar em pacientes adolescentes e adultos varia de 0 a 80%, dependendo da população estudada (Brewer, 2000; Britton e Palendira, 2003; Liu *et al.*, 2009). Dessa maneira, estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes e economicamente viáveis têm sido alvo de intensa investigação.

As proteínas secretadas por *M. tuberculosis* nos primeiros estágios de infecção são consideradas alvos para a obtenção de antígenos candidatos a vacinas, pois, presumivelmente, elas são as primeiras a estabelecerem um contato com o sistema imunológico do hospedeiro. A família ESAT-6 (“6-kDa Early Secreted Antigenic Target”) agrupa pequenas proteínas secretadas por *M. tuberculosis*, sobretudo na fase inicial do crescimento (Renshaw *et al.*, 2002). ESAT-6 é um fator de virulência codificado na região

genômica chamada RD-1, região esta ausente em *Mycobacterium bovis* atenuado, ou seja, na BCG (Gey van Pittius *et al.*, 2001), mas presente em todas as linhagens virulentas de *M. tuberculosis* (Harboe *et al.*, 1996). Mais ainda, trabalhos prévios (Andersen *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1995) demonstraram que ESAT-6, seja como uma vacina de subunidade ou como uma vacina de DNA (Kamath *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2000), é capaz de induzir a proteção de IFN- γ por células T em camundongos infectados, resultando em proteção.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo a construção do plasmídeo vacinal pValac:ESAT-6 e verificação de sua funcionalidade, *in vitro*, assim como sua clonagem na linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA; o que representa um primeiro passo rumo ao desenvolvimento de uma nova vacina gênica oral contra a TB.

Enfim, o trabalho aqui apresentado, e ainda em andamento, faz parte de uma nova linha de pesquisa que visa implementar e testar a eficácia e a efetividade de novas vacinas gênicas, baseadas no uso de BL geneticamente modificadas, por via de administração em mucosas

1.3 Estrutura da dissertação

Este manuscrito apresenta, em sua primeira seção, uma revisão de literatura dividida em três assuntos principais: (i) as vacinas de DNA, seu mecanismo de ação e as principais vias de entrega; (ii) as Bactérias Lácticas (BL) como veículos para entrega de plasmídeos vacinais, especialmente no que concerne ao uso de linhagens invasivas de *Lactococcus lactis* e (iii) as características do bacilo *Mycobacterium tuberculosis*; a Tuberculose como sendo uma doença reemergente no mundo e as vacinas em desenvolvimento contra esta doença, especialmente utilizando-se o antígeno ESAT-6. Em seguida, encontram-se os objetivos do trabalho e a metodologia utilizada para o desenvolvimento do mesmo. A seguir, os resultados serão apresentados e discutidos, divididos em três partes: (i) a obtenção do plasmídeo pValac:ESAT-6; (ii) a verificação da funcionalidade do pValac:ESAT-6 em células eucarióticas e (iii) a clonagem do respectivo plasmídeo na linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA. Por fim, as conclusões e as perspectivas do presente trabalho serão demonstradas, seguindo-se as Referências Bibliográficas.

II. INTRODUÇÃO

II. INTRODUÇÃO

II.1 Vacinas de DNA

II.1.1 Histórico das Vacinas de DNA

Muitos avanços ocorreram desde que o médico inglês Edward Jenner imunizou James Phipps contra a varíola em 1796 e criou o que, anos mais tarde, ficou conhecido como "vacina" (Stewart e Devlin, 2006). Desde as primeiras vacinas vivas atenuadas ou mortas até a nova era das vacinas de DNA, no início dos anos 1990, a biologia molecular e microbiologia têm ajudado no controle e na profilaxia de diversas doenças infecciosas, cânceres, alergias e doenças auto-imunes, induzindo rápida e eficiente resposta imune ou criando tolerância imunológica (Ferrera *et al.*, 2007).

Dentre as atuais formulações vacinais, as "vacinas de DNA" são as mais recentes formas de vacina e representam uma interessante alternativa para a apresentação de moléculas antigênicas ao sistema imune. Elas consistem na administração de vetores contendo um cassete de expressão eucariótico, responsável por codificar o antígeno de interesse no hospedeiro, possibilitando a geração de antígenos, *in vivo*, (Gurunathan *et al.*, 2000a), levando a apresentação deste ao sistema imune e proteção.

Os primeiros estudos que sugeriram que a injeção de uma vacina de DNA ("plasmídeo de DNA"), *in vivo*, poderia levar à expressão do antígeno e à produção da proteína foram realizados por Ito (Ito, 1960), demonstrando que a injeção de DNA nu de papilomavírus podia induzir tumores em coelhos. Além disso, Atanasiu e colaboradores (Atanasiu *et al.*, 1962) obtiveram resultados semelhantes após a inoculação de hamsters com poliomavírus, enquanto outros grupos relataram que utilizando técnicas similares poderiam induzir miócitos cardíacos de ratos a expressar β -galactosidase recombinante (Wolff *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1990; Kitsis *et al.*, 1991).

No entanto, a primeira evidência na literatura do uso imunológico de uma molécula de DNA foi em 1992 por Tang *et al.* (Tang, DeVit e Johnston, 1992). Seus estudos mostram que a injeção da seqüência codificadora do hormônio do crescimento humano na pele de camundongos utilizando a técnica de *gene gun*, foi capaz de aumentar anticorpos específicos contra este hormônio, sugerindo que o DNA poderia ser utilizado para induzir resposta imune contra infecções patogênicas. Naquele ano, na Reunião Anual de Vacinas no "Cold Spring Harbor Laboratory", pesquisadores dão origem a uma nova era de vacinas, com a apresentação de três trabalhos reportando o uso de vacinas de DNA para

estimulação da resposta imune humoral e celular contra patógenos e tumores, *in vivo*. Dois destes trabalhos demonstravam a geração de resposta imune contra o vírus influenza e um para o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) (Ulmer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993). Posteriormente, resultados semelhantes foram obtidos após a imunização com DNA contra o vírus herpes bovino I (Cox *et al.*, 1993) e contra o vírus da raiva (Xiang *et al.*, 1994).

II.1.2 Vantagens das vacinas de DNA

As vacinas de DNA apresentam inúmeras vantagens sobre as vacinas tradicionais em termos de segurança, facilidade de fabricação, estabilidade e imunogenicidade (Tabela 1). Dentre as vantagens, as vacinas de DNA podem induzir tanto a resposta imune humoral quanto a celular, sendo ainda seguras. Ensaios clínicos com vacinas de DNA têm demonstrado menor incidência de efeitos adversos tais como vermelhidão, dor transitória, inchaço, febre e cefaléia (Cattamanchi *et al.*, 2008). Além disto, as vacinas de DNA têm ainda a vantagem de ser usadas terapêuticamente (Delavallee *et al.*, 2008). Uma vez que elas não são capazes de induzir auto-imunidade ao plasmídeo vacinal, como é o caso de vacinas recombinantes, teoricamente as vacinas de DNA poderiam ser utilizadas como reforço ilimitadamente; o que poderia ser especialmente útil no campo de desenvolvimento de vacinas contra o câncer, que dependem de repetidos reforços de respostas de células T aos antígenos tumorais.

Uma outra vantagem das vacinas de DNA é que elas, diferentemente das vacinas vivas e de subunidade, são altamente estáveis e não requerem refrigeração. Portanto, as vacinas de DNA podem ser mais práticas para o uso em países em desenvolvimento. Além disto, devido a sua estrutura simples, modificações na construção do plasmídeo vacinal podem ser feitas em um curto período de tempo. Uma vez que as vacinas de DNA podem também ser facilmente replicadas e amplificadas em bactérias, permiti-se uma produção barata, em larga escala e em um curto período de tempo (Kutzler e Weiner, 2008), não havendo necessidade de produção e purificação do antígeno individual (Wolff *et al.*, 1990).

Tabela 1: Vantagens na utilização das vacinas de DNA (adaptado de Kutzler e Weiner, 2008)

Vantagens	Características
Construção	Modificações no plasmídeo vacinal podem ser feitos em curto período de tempo
	Possibilidade de otimização dos plasmídeos e transcrito
	Utilização dos avanços da genômica para a construção da vacina
Tempo de manufatura	Rápida produção e formulação
	Reproduzível em produção em larga escala
Segurança	Incapacidade de reversão a formas virulentas como as vacinas vivas
	Diferentemente de algumas vacinas inativadas, a eficácia não depende de tratamentos tóxicos
	Nenhum efeito adverso significativo nos ensaios clínicos até o momento
Estabilidade	Maior termo-estabilidade em relação as outras vacinas
	Maior vida útil
Mobilidade	Fácil estocagem e transporte
	Não é necessário refrigeração constante
Imunogenicidade	Indução resposta imune celular e humoral assim como as vacinas vivas

Questões têm sido levantadas com relação à segurança das vacinas de DNA, como seu potencial de integração ao genoma, o desenvolvimento de auto-imunidade, bem como a possibilidade de resistência ao antibiótico utilizado para seleção do plasmídeo em células bacterianas. As vacinas de DNA que estão sendo testadas atualmente não apresentam níveis relevantes de integração no genoma da célula hospedeira (Temin, 1990; Kurth, 1995; Manam *et al.*, 2000; Ledwith *et al.*, 2000; Pal *et al.*, 2006; Sheets *et al.*, 2006). Com relação ao desenvolvimento da auto-imunidade, estudos pré-clínicos em primatas não humanos e os primeiros estudos em seres humanos não detectaram aumento de anticorpos antinucleares ou anti-DNA, não havendo evidência convincente do desenvolvimento de auto-imunidade em resposta a vacina de DNA (Bagarazzi *et al.*, 1997; MacGregor *et al.*, 1998; Le *et al.*, 2000; Klinman *et al.*, 2000; MacGregor *et al.*, 2000). Já o gene de resistência ao antibiótico presente no plasmídeo vacinal é restrito a apenas um antibiótico, em particular a canamicina, não comumente utilizada para tratar infecções humanas. Porém, estratégias alternativas ao uso de antibióticos como marcador de seleção vem sendo exploradas (Mairhofer *et al.*, 1997; Cranenburgh *et al.*, 2001; Garmory *et al.*, 2005).

II.1.3 Vacinas de DNA aprovadas e em ensaios clínicos

Os plasmídeos de DNA constituem uma nova geração de produtos biotecnológicos utilizados tanto como vacinas quanto para terapia gênica que estão apenas começando a entrar no mercado. Os plasmídeos de DNA podem ser aplicados como vacinas de DNA preventivas ou terapêuticas para doenças virais, bacterianas ou parasitárias, ou ainda para o câncer. Os progressos nesta área resultaram no desenvolvimento e comercialização de quatro vacinas de DNA licenciadas, para uso veterinário, sendo duas delas para doenças infecciosas: vacina para vírus do Nilo Ocidental em cavalos (Center for Disease Control and Prevention and Fort Dodge Laboratories - USA) e vírus da necrose hematopoética infecciosa em salmão (Novartis - Canadá). Além disto, uma vacina contra o câncer maligno melanoma em cães (Merial - USA) e uma para terapia relacionada à liberação hormonal do fator de crescimento em suínos (VGX Animal Health - Austrália) também foram aprovados (Kutzler e Weiner, 2008). Atualmente, diversos ensaios clínicos, profiláticos e terapêuticos, utilizando vacinas de DNA vêm sendo realizados (www.clinicaltrials.gov), como vacinas de DNA contra o câncer, gripe, malária, hepatite B e HIV-1 (Tacket *et al.*, 1999; Mincheff *et al.*, 2000; Le *et al.*, 2000; Liu e Ulmer, 2005; Ulmer, Wahren e Liu, 2006). Estes testes demonstraram que as vacinas de DNA são bem toleradas e seguras, uma vez que não foram relatados eventos adversos em todos os estudos já concluídos.

II.1.4 Estruturas dos vetores para vacinas de DNA

Basicamente, as vacinas de DNA são compostas de vetores codificando antígenos vacinais. Estes vetores contêm um gene de resistência a antibiótico controlado por um promotor procariótico e uma origem procariótica de replicação, permitindo a seleção e replicação dos plasmídeos em bactérias transformadas, respectivamente. A unidade de transcrição é geralmente composta por um promotor viral forte e constitutivo, que confere um alto nível de expressão da ORF de interesse em células eucarióticas, e uma sequência sinal de poliadenilação (Figura 1) (Feltquate, 1998; Gurunathan *et al.*, 2000b).

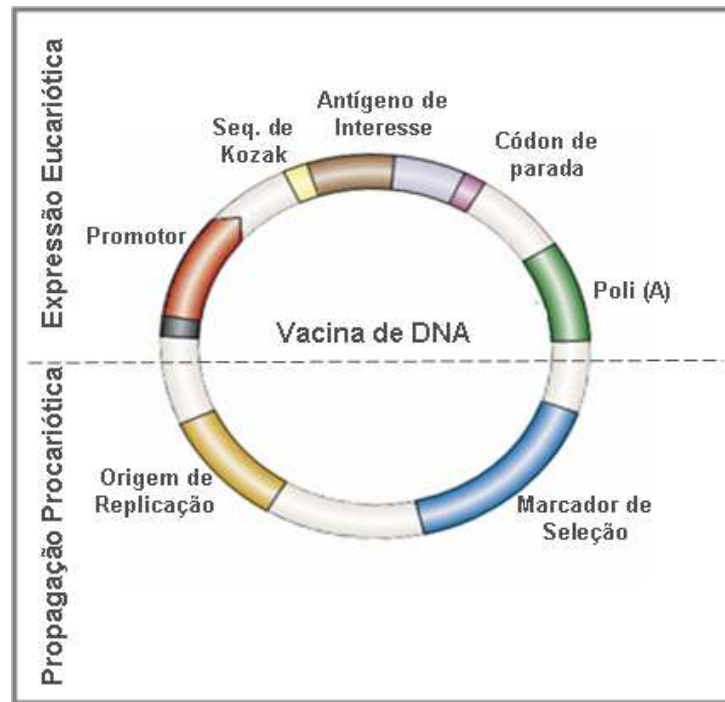


Figura 1: Representação esquemática de um plasmídeo para uso como vacina de DNA. Na parte superior da figura encontra-se a Região de Expressão Eucariótica, responsável pela expressão do antígeno em células eucarióticas, contendo o promotor que promove a expressão da ORF de interesse, contendo a seqüência de Kozak e códon de parada, e a seqüência sinal de poliadenilação (Poli-A) para estabilização do transcrito primário. Na parte inferior encontra-se a Região de Propagação Procariótica, responsável pela propagação e manutenção do plasmídeo vacinal na célula bacteriana, contendo assim uma origem de replicação procariótica e um marcador de seleção, respectivamente (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

Atualmente todos os vetores utilizados para vacina gênica ou terapêutica utilizam origens de replicação teta e a grande maioria destes plasmídeos são derivados de pBR322 ou pUC, com a origem de replicação ColE1 de *Escherichia coli* (Williamsa *et al.*, 2009). ColE1 é o sistema melhor caracterizado, sendo capaz de manter mais de 20 plasmídeos por célula de *E. coli*, o que resulta em alta produção de DNA plasmidiano em um período relativamente curto de tempo (Ingolotti *et al.*, 2010).

Os marcadores de seleção mais utilizados são genes que conferem resistência a antibióticos, sendo também responsáveis pela estabilidade/manutenção do plasmídeo na célula bacteriana, sendo a resistência a canamicina a mais utilizada (Ingolotti *et al.*, 2010).

No cassete de expressão eucariótica, os promotores virais, tais como o do Citomegalovírus (pCMV), Rous vírus (pRSV), Símio vírus (pSV40), Baculovírus (promotor da polihedrina) e Herpes simplex vírus tipo 1 (promotor da timidina quinase) são frequentemente utilizados para a expressão do transgene ou antígeno de interesse em uma grande variedade de células mamíferas (Becker *et al.*, 2008). O pCMV é o mais usado atualmente, por promover um alto nível expressão constitutiva. Estudos têm sugerido que várias citocinas podem regular diferencialmente o pCMV, sendo que IFN- γ e IL-10 têm

demonstrado *down-regulation* na atividade. Além disto, o uso de promotores não-virais tem sido investigado. Apesar da relativa fraqueza da atividade destes promotores em relação aos seus homólogos virais, o uso de promotores não-virais, como o promotor do gene do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (MHC II) são possíveis alternativas (Vanniasinkam *et al.*, 2006). Promotores quiméricos e outros promotores sintéticos também estão sendo considerados (Shepherd e Scott, 2008; Seleem *et al.*, 2008), como o promotor quimérico SV40-CMV, onde a melhora na expressão e/ou na imunogenicidade têm sido observados (Kutzler e Weiner, 2008).

A possibilidade de codificar múltiplas proteínas em uma única construção é uma vantagem importante que as vacinas de DNA têm sobre outros tipos de vacinas, pois há possibilidade de adição de mais de um antígeno de interesse (Capone *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2009). A inserção de uma seqüência consenso específica presente no mRNA eucarioto, sinalizando o *start codon*, denominada seqüência de Kozak (ACCATGG), é necessária para iniciação da síntese protéica em células eucarióticas. Para garantir a terminação correta da proteína, também é importante a inserção de um ou mais *stop codons*, impedindo a leitura incorreta do mRNA, como produtos de alto peso molecular e incorretamente dobrados (Kutzler e Weiner, 2008).

A inclusão de um sítio de rescisão, ou seqüência sinal de poliadenilação (AAUAAA) junto à extremidade 3' da sequencia de interesse, é essencial para expressão eucariótica. O sinal de poliadenilação é necessário para a correta finalização da transcrição da ORF de interesse (clivagem do pré-mRNA de 11-30 nucleotídeos *downstream* a seqüência), adição da cauda poli-A e exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, desempenhando um papel importante na estabilidade do mRNA (Kutzler e Weiner, 2008). A maioria dos vetores contém o sinal de poliadenilação de SV40 ou do Hormônio Bovino do Crescimento (BGH). Estudos têm revelado que a sequencia sinal de poliadenilação do BGH é até duas vezes mais eficiente que as demais, sendo por isso a mais comumente utilizada (Xu *et al.*, 2002).

II.1.5 Otimização da imunogenicidade na construção de vacinas de DNA

Códon usage

A otimização dos códons (*codon usage*) tem sido utilizada para maximizar a expressão da ORF de interesse na célula hospedeira, o que envolve alteração específica da seqüência codificadora com base nos níveis de tRNA geralmente disponíveis naquela célula. Desta forma, será otimizada a utilização dos códons para tRNAs que são mais abundantes na célula, o que pode resultar em maiores taxas de tradução da proteína, conforme descrito por diversos autores (Kim e Sin, 2005; Tokuoka *et al.*, 2008; Li *et al.*,

2008; Muthumani *et al.*, 2008). Além disso, a otimização do mRNA também é essencial para maior expressão da seqüência de interesse. Grande número de seqüências ricas em C-G no mRNA pode inibir a tradução da proteína devido ao aumento da formação de estruturas secundárias. A presença de sítios de processamento do pré-RNA são capazes de causar expressão anômala da sequencia de interesse (Besse e Ephrussi, 2008).

Customização da seqüência antigênica

Em adição a otimização dos códons, a ORF de interesse também pode ser modificada para produção de proteínas secretadas, ligadas a membrana, citosólica ou associada a uma organela. Assim, alterando a localização celular, a resposta imunológica pode ser influenciada (Becker *et al.*, 2008), como por exemplo, o aumento da taxa de secreção pode otimizar a produção de anticorpos (Haddad *et al.*, 1997). Além disto, a sinalização dos antígenos de interesse à degradação por proteossomos ou endossomos utilizando fusões com ubiquitina, também pode aumentar o número de peptídeos disponíveis à ligação as MHC I, quando é necessária a ativação de linfócitos citotóxicos. Além disto, se é preciso expressar mais de uma ORF de interesse (como antígenos e citocinas) para geração da resposta imune, há a possibilidade de se utilizar um sistema de expressão policistrônico ou ainda fazer uso de epítomos fundidos, expressos como um único polipeptídeo (Becker *et al.*, 2008).

Motivos CpG

Seqüências imunoestimulatórias, chamadas motivos citosina-fosfato-guanina (motivos CpG) não metilados, são responsáveis pela ativação do receptor Toll-like 9 (TLR-9) através de dimerização. Assim, eles desempenham um papel fundamental na imunidade inata e adaptativa pela estimulação de linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e células “Natural Killer” (Células NK) (Li e Zhu, 2006; Kumagai *et al.*, 2008). A célula pode discriminar entre DNA endógeno e DNA exógeno com base nestes motivos, sendo estas seqüências praticamente ausentes em células humanas, apresentando assim propriedade adjuvante nas vacinas de DNA (Angel *et al.*, 2008).

Regiões não traduzidas (UTRs)

Regiões não traduzidas (UTRs) também são responsáveis pela regulação da expressão gênica por elementos localizados a 5' e 3' da ORF de interesse. Elementos *enhancer* (potenciador) e trans-ativadores da transcrição podem aumentar a atividade do promotor, quando colocados a 5' ou 3' da ORF de interesse. Alguns dos trans-ativadores que têm sido estudados são de origem viral, como regiões regulatórias (R) agindo como potenciador transcricional e pós-transcricional: vacinas de DNA com o promotor CMV-R

eleva substancialmente a geração de resposta imune celular específica ao HIV-1 em camundongos e primatas (Barouch *et al.*, 2005). No entanto, o uso de reguladores de origem viral não é considerado seguro para uso em vacinas, devido à sua associação com oncogênese. Assim, a pesquisa e o teste de outros trans-ativadores e elementos *enhancer* de origem não viral em vacinas de DNA é muito importante.

A adição de seqüências líder ou região 5' não-traduzida (5'-UTR) antes da ORF de interesse pode aumentar a estabilidade do mRNA e contribuir para uma maior eficiência de tradução. Por exemplo, um aumento acentuado na produção de proteína foi detectado quando a seqüência líder nativa da glicoproteína de envelope de HIV foi substituída pela seqüência líder ativadora do plasminogênio tecidual humano (Xu *et al.*, 2001). Aumento na expressão de antígenos plasmídicos também é observado utilizando a seqüência líder do gene IgE (Yang *et al.*, 2002; Kutzler *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006a).

Adjuvantes

Além disto, pesquisas vêm demonstrando que a co-injeção de plasmídeos imunomoduladores constitui uma estratégia promissora para melhorar a eficácia das vacinas de DNA. Estes plasmídeos codificam citocinas, como interleucinas (IL), interferons, fatores estimulatórios de colônia e fator de necrose tumoral, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias. O objetivo é aumentar a quantidade e a potência das células apresentadoras de antígenos (APCs) com estes adjuvantes, sem os efeitos adversos da administração de citocinas na forma de proteínas purificadas. Recentemente, testes em macacos com a vacina de DNA em desenvolvimento contra HIV-1 mostram que a co-administração de plasmídeos codificando IL-12 e IL-15 aumentou a imunidade celular e humoral (Chong *et al.*, 2007).

Para melhorar a imunogenicidade da vacina, ao invés de aumentar o número de doses, pesquisadores sugerem o uso de uma vacina mista, onde a primeira dose da vacina tem uma formulação e o reforço tem uma formulação diferente, denominado *prime-boost* (dose-reforço) (Wang *et al.*, 2004). Esta estratégia aumenta a potência da vacina de DNA, particularmente a produção de anticorpos (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001). A estratégia *prime-boost* têm sido aplicada a um grande número de vacinas, incluindo o HIV (Dale *et al.*, 2006; Kent *et al.*, 2007; Patterson e Robert-Guroff, 2008), vírus da gripe aviária (Pan *et al.*, 2009) e malária (Moore e Hill, 2004), demonstrando que esta técnica pode produzir melhores resultados imunológicos.

Seqüências de endereçamento nuclear

O envelope nuclear representa um grande obstáculo ao plasmídeo de DNA após a entrada na célula. Assim, para aumentar a expressão da sequência codificadora de

interesse, a otimização do direcionamento do vetor para o núcleo é de extrema importância. Foi verificado que a importação nuclear de DNA é um processo otimizado por seqüências específicas em vírus. Em SV40, uma seqüência de 72 pb é capaz de conduzir a importação do plasmídeo ao compartimento nuclear (Dean *et al.*, 1999), chamada de seqüência de endereçamento nuclear. Esta seqüência contém sítios de ligação para vários fatores de transcrição. Devido ao fato destes fatores apresentarem sinais de localização nuclear, o complexo proteína-plasmídeo é transportado através do poro nuclear pela maquinaria de importação nuclear da célula hospedeira (Dean, 1997; Wilson *et al.*, 1999). Sinais de localização nuclear mediam também a importação de outros genomas virais, com o de HIV e adenovírus (Bukrinsky *et al.*, 1992; Greber e Kasamatsu, 1996). Ainda mais, seqüências de endereçamento nuclear derivadas de promotores tecido-específicos são capazes de ligar-se a fatores de transcrição expressos somente nestes tecidos, o que levaria a otimização da expressão da seqüência de interesse em células específicas, uma vez que outros tipos celulares não expressam os fatores necessários à importação nuclear (Miller e Dean, 2009).

II.1.6 Mecanismo de ação das vacinas de DNA

Embora o mecanismo de indução da imunidade por vacinas de DNA ainda permaneça incerto, o aumento lento da resposta imune após a vacinação com DNA sugere que este siga um caminho complexo que pode mimetizar a infecção viral natural. Acredita-se que uma vez que o DNA plasmidiano é administrado e internalizado pela célula, estes utilizam a rede de microtúbulos e suas proteínas motoras associadas para o tráfego através do citoplasma para o núcleo (Vaughan e Dean, 2006), e a transcrição do imunogene é iniciada utilizando o maquinário celular do hospedeiro (Kutzler e Weiner, 2008). Diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas de DNA resultam em uma exibição antigênica via moléculas de MHC I e MHC II, como a infecção natural, ativando linfócitos T CD4+, TCD8+ e a produção de anticorpos.

Logo após, APCs carregadas com o antígeno podem migrar para o linfonodo, ativando linfócitos T via MHC e receptores de células T (TCR), ativando também linfócitos B via receptores de células B (BCRs), induzindo assim a produção de anticorpos (Kutzler e Weiner, 2008). A ativação inicial de células T e B é pequena, mas uma vez que essas células migram de volta para o tecido transfectado, elas podem sofrer re-estimulação. Neste ponto, as células T CD8 podem lisar as células transfectadas que apresentam peptídeos antigênicos, levando a liberação de mais antígeno. Além disso, as células T CD4 podem ativar células dendríticas imaturas (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001), repetindo o ciclo de ativação (Figura 2).

Assim, os diferentes tipos de resposta imune induzida pela imunização genética justificam sua aplicação nos campos das doenças infecciosas, das alergias e dos tumores. Tanto uma resposta tipo TH1 quanto TH2 são induzidas, dependendo da via de entrega da vacina de DNA, podendo ser empregada para controle de infecções intracelulares, como leishmaniose, tuberculose, toxoplasmose, brucelose, listeriose e alergias assim como direcionado ao controle de infecções extracelulares, como esquistossomose e outras doenças (Azevedo e Oliveira, 2003).

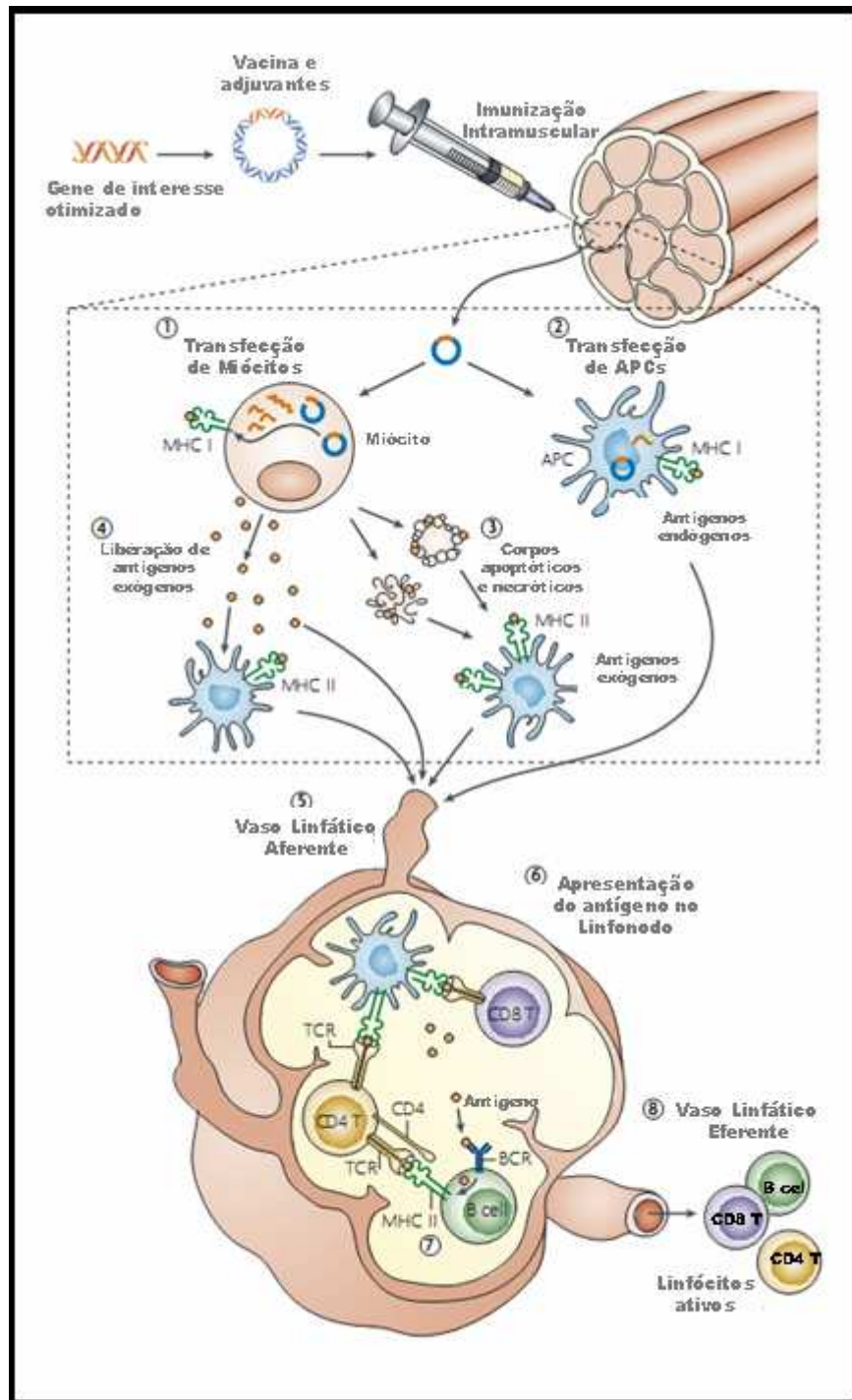


Figura 2: Representação esquemática da indução da imunidade celular e humoral por vacinas de DNA. Após a imunização intramuscular com a vacina de DNA, (1) miócitos e (2) APCs são transfectados. Após a expressão do antígeno de interesse, estes são apresentados ao sistema imune via MHC I. O antígeno pode ainda ser secretado pelos miócitos ou há a formação de corpos apoptóticos/necróticos que irão levar a apresentação antigênica por APCs via MHC II. As APCs migram para o linfonodo e ativam linfócitos T CD4 e T CD8. Antígenos livres levam ainda a ativação de linfócitos B. TCR: Receptor de Célula T; BCR: Receptor de Célula B, (Adaptado de Kutzler e Weiner, 2008).

II.1.7 Barreiras para transferência gênica

Para maximizar o potencial de vacinas gênicas não-virais, os níveis de expressão devem ser melhorados. Infelizmente, muitas barreiras extra-celulares e intracelulares (incluindo células do sistema imune, a membrana celular, a rede de citoesqueleto e a membrana nuclear) impedem a transferência do plasmídeo eficientemente (Miller e Dean, 2009).

Para que haja sucesso na vacinação com DNA, o vetor deve atingir o núcleo para que a transcrição do transgene ocorra. Para isto, há uma série de barreiras celulares que impedem a transferência de DNA exógeno para seu tecido alvo. Inicialmente, enquanto os vetores estão no meio extracelular, estes podem ser degradados por nucleases do soro ou ainda detectados por leucócitos. O DNA desprotegido ou nu é degradado em poucos minutos, o que ilustra a necessidade de atravessar rapidamente a membrana plasmática das células-alvo (Lechardeur *et al.*, 1999). No entanto, atravessar a membrana plasmática não é uma tarefa fácil, devido à densa barreira da matriz extracelular e à repulsão elétrica da membrana lipídica aos vetores de DNA (Miller e Dean, 2009).

Outro obstáculo à transferência gênica são as barreiras intracelulares. O envelope nuclear representa um grande obstáculo ao plasmídeo. Os métodos mais atuais de transferência gênica requerem células em constante divisão, o que gera a desintegração do envelope nuclear, resultando em maior acesso do plasmídeo vacinal ao núcleo. Foi demonstrado que células em divisão são 90% mais eficientes em expressar os transgenes do que células que não estão se dividindo (Fasbender *et al.*, 1997).

II.1.8 Vias de entrega das vacinas de DNA

Um dos aspectos mais importantes para o sucesso da estratégia de vacina de DNA parece ser a via de entrega. Uma série de rotas de aplicação do DNA plasmidiano têm sido investigadas para melhorar a indução de respostas imunes. Tradicionalmente, a pele tem sido a abordagem mais popular para a vacinação, devido à sua acessibilidade e dimensão. A rota mais comum de imunização usada em estudos com vacinas de DNA é a injeção intramuscular (Kutzler e Weiner, 2008). No entanto, vários estudos têm demonstrado a importância de transfecção direta de APCs (Condon *et al.*, 1996; Porgador *et al.*, 1998), sendo que após as imunizações intramusculares, o tipo dominante de células transfectadas com a vacina de DNA são miócitos (Danko *et al.*, 1997). Por se tratar de uma rota invasiva, vacinas administradas parenteralmente são pouco eficientes em estimular o sistema imune associado às mucosas, sendo efetivas somente contra patógenos que penetram no organismo pela rota sistêmica. Além disto, as vacinas administradas por via intramuscular

utilizam DNA nu (*naked DNA*), o que requer múltiplas doses de grandes quantidades de plasmídeo (Lowrie *et al.*, 1997).

Assim, diferentes métodos cutâneos para a entrega do plasmídeo vacinal vêm sendo investigados, como a injeção intradérmica ou subcutânea, cujos alvos são fibroblastos e queratinócitos; o uso tópico, como o *DermaVir*, que transfecta células de Langerhans - as APCs da pele - por meio de um adesivo cutâneo (Lori *et al.*, 2007) e o *Painting DNA*, que consiste em descascar algumas camadas da pele, a fim de obter uma transfecção mais eficiente (Watabe *et al.*, 2001).

A biobalística ou *gene gun* é um outro método para aumentar a entrega epidérmica de DNA, onde as células de Langerhans e queratinócitos são diretamente transfectados pelo bombardeio de partículas de ouro revestidas com os plasmídeos de DNA (Fuller *et al.*, 2006) e o uso de ultra-som de baixa frequência como um adjuvante físico para a imunização transcutânea (Tezel *et al.*, 2005). Porém, diversos trabalhos têm preferido rotas especiais de administração para fins específicos, como: mucosa vaginal (Kanazawa *et al.*, 2008), intranasal (Brave *et al.*, 2008) e mucosa gástrica (Guimarães *et al.*, 2009).

Adicionalmente, tem sido amplamente estudado o método de eletroporação ou electroporabilidade para a entrega de vacinas de DNA. A aplicação de pulsos de alta voltagem com duração de milissegundos em um tecido pode interromper a membrana celular e gerar poros que podem persistir por horas e permitir a entrada de macromoléculas, tais como drogas, peptídeos e vacinas de DNA no citoplasma (Zaharoff *et al.*, 2002). A nanotecnologia também vem sendo explorada para facilitar a internalização da vacina de DNA. Esta tecnologia é atualmente aplicada na entrega de drogas, mas já está sendo estudada para a entrega de vacinas de DNA e terapia gênica (Peek, Middaugh e Berkland, 2008).

Além disso, pesquisas levaram a uma série novas tecnologias que podem ser aplicáveis às vacinas de DNA (Ogura *et al.*, 2008; Whitehead e Mitragotri, 2008; Van Damme, 2009), como a transferência do DNA auxiliado por um sistema vesicular. Este sistema envolve a aplicação de uma vacina na pele intacta facilitada por um transportador, como lipossomas (Xu, Ding e Yang, 2008) ou utilizando-se micropartículas poliméricas biodegradáveis (O'Hagan *et al.*, 2006), já amplamente utilizadas para entrega de drogas (Donnelly *et al.*, 2003).

Por outro lado, o uso de vírus, como o adenovírus (Benihoud *et al.*, 1999), Retrovírus (Hu e Pathak, 2000) ou Vaccinia virus (Moorthy *et al.*, 2003) também vem sendo utilizados para a transferência de DNA plasmidiano para a célula hospedeira (Somia e Verma, 2000; Moorthy *et al.*, 2003).

Porém, a estimulação de uma resposta imune eficaz contra um determinado antígeno, depende da presença deste em quantidades suficientes e em uma forma que

possa ser facilmente reconhecido pelo sistema imune. Nesse contexto, bactérias geneticamente modificadas representam uma alternativa promissora para a entrega de plasmídeos vacinais. O uso de bactérias como carreadoras deste tipo de vacina têm vantagens sobre o uso de vírus, uma vez que estes possuem limitações quanto ao tamanho do material genético que pode ser carregado pela partícula viral (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003a).

II.1.9 Bactérias na entrega de vacinas de DNA

A transferência de genes de bactérias às células de mamíferos foi observada, *in vitro*, por Schaffner (1980), quando as cópias em tandem do genoma do vírus SV40 carregadas por *E. coli* foram transferidas em co-cultura para células de mamíferos. Quinze anos depois, Sizemore *et al.* (1995) desenvolveram um sistema utilizando *Shigella* invasiva para transferência do DNA plasmidiano, capaz de entrar facilmente no citoplasma das células infectadas (Courvalin *et al.*, 1995; Sizemore *et al.*, 1995). A bactéria invasiva atenuada entra na célula eucariótica em uma vesícula primária, que logo após é fundida a um compartimento lisossômico, ocorrendo a lise bacteriana. O DNA plasmidiano pode, então, escapar da vesícula para o citoplasma e, em seguida, ser translocado para o núcleo da célula, onde ocorre a expressão da ORF de interesse para posterior apresentação ao sistema imune (Figura 3) (Schoen *et al.*, 2004).

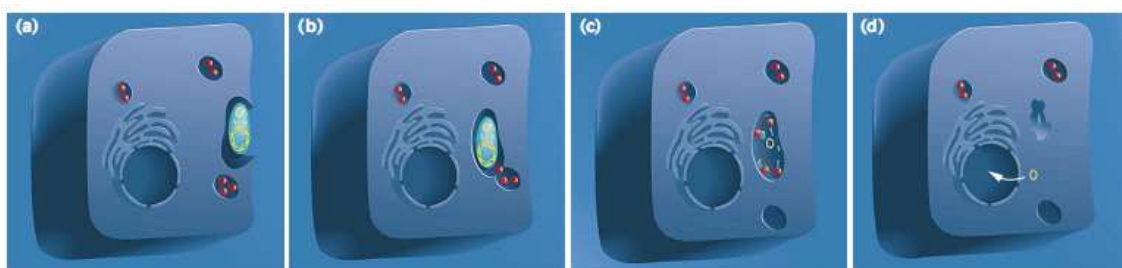


Figura 3: Representação esquemática da transferência de DNA de uma bactéria invasiva atenuada para uma célula eucariótica. (A) Entrada da bactéria em uma vesícula primária da célula hospedeira, (B) Fusão da vesícula primária com o compartimento lisossômico, (C) lise bacteriana, (D) Escape do plasmídeo de DNA da vesícula para o citoplasma e, em seguida, para o núcleo da célula (Grillot-Courvalin *et al.*, 1999).

Neste sistema de entrega, as bactérias atravessam a membrana plasmática da célula alvo, entregando o plasmídeo vacinal diretamente no interior da célula, o que não é uma tarefa fácil para vacinas de DNA nu, devido à densa barreira da matriz extracelular. Além disto, as bactérias protegem o DNA de degradação por nucleases e também podem

agir como adjuvantes naturais após a invasão da célula hospedeira, devido a presença de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), capazes de modular a resposta imune inata, e assim promover uma resposta adaptativa robusta e duradoura (Hoebe *et al.*, 2004). Comparado à maioria dos vírus utilizados como carreadores de vacinas de DNA, bactérias são fáceis de cultivar e permitem a manutenção dos plasmídeos devido a sua capacidade de multiplicação elevada. Em contraste com a imunização utilizando DNA nu, as etapas de purificação do plasmídeo não são mais necessárias, reduzindo ainda mais os custos. Além disto, a maioria das bactérias transportadoras permite a imunização da mucosa através de via oral, além de mostrarem um tropismo natural pela indução do sistema imunológico, por gerar sinais de perigo ao hospedeiro, o que leva a uma ativação mais eficiente do sistema imunológico em relação à imunização com DNA nu (Schoen *et al.*, 2004).

Além disto, o uso de bactérias como transportadoras de plasmídeo de DNA tem sido aplicado para vacinação genética em modelos animais contra doenças infecciosas, como para infecção com HIV-1, vírus do sarampo, vírus da hepatite B e *Mycobacterium tuberculosis* (Schoen *et al.*, 2004) e também contra tumores, sendo que muitas bactérias tem tropismo por tecidos específicos, o que pode, assim, permitir que a entrega seletiva dos plasmídeos de DNA, às células tumorais, seja alcançada (Yu *et al.*, 2004).

II.1.9.1 Aspectos imunológicos

Em contraste com a imunização parenteral convencional, a entrega de vacinas a nível de mucosas tem a capacidade de estimular tanto a resposta imune de mucosas quanto a sistêmica (humoral e celular) (Walker, 1994). Com poucas exceções, a maioria das linhagens bacterianas utilizadas no transporte e entrega de plasmídeos vacinais são patógenos intestinais humanos atenuados. O uso de bactérias entéricas humanas é particularmente vantajoso devido a sua capacidade de infectar a mucosa do cólon intestinal após a administração oral. Depois de atravessar a mucosa do intestino (principalmente através das células M), grande parte das bactérias é capturada por APCs nos tecidos linfóides (placas de Peyer), propagando para o baço, fígado e linfonodos. Foi verificado que, além de macrófagos e outras células fagocíticas, células dendríticas (DC) desempenham um papel central na captação e defesa contra patógenos entéricos (Schoen *et al.*, 2004).

As DC são APCs localizadas nos grandes portais de entrada microbiana do organismo, capaz de detectar patógenos e desencadear a ativação de células T, através da apresentação de antígenos via MHC I e II (Banchereau e Steinman, 1998). No intestino, DC residem como células imaturas nas placas de Peyer. Foi proposto que estas células são

ainda capazes de ultrapassar as junções entre as células epiteliais, engolfando diretamente as bactérias fora do epitélio, controlando o conteúdo do lúmen intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Neste caso, após a ingestão, a bactéria transfere o DNA plasmidiano para o citoplasma da DC, este atinge o núcleo e é expresso pela célula. O antígeno por sua vez é reconhecido como endógeno e então apresentados via moléculas MHC I, gerando uma resposta específica T CD8+. Portanto, bactérias entéricas são altamente capazes de entregar vacinas de DNA para DC (Paglia *et al.*, 1998), consideradas as principais células alvo para o processamento antigênico.

Desta forma, o antígeno codificado no plasmídeo vacinal é produzido tanto por células infectadas quanto por APCs. A proteína antigênica apresentada por células infectadas nucleadas via MHC I são então capturadas por uma outra APC para posterior processamento e apresentação para células T via MHC II para ativação de linfócitos T CD4+ (helper) e linfócitos B (produção de anticorpos). APCs diretamente infectadas pela bactéria apresentam o antígeno via moléculas MHC I para ativação de linfócitos T CD8+ (citotóxicos) (Schoen *et al.*, 2004). A geração de uma resposta imune mista, com a ativação de linfócitos T CD8+ e T CD4+, é um fenômeno conhecido como cross-priming (Gurunathan *et al.* 2000b; Sheikh e Morrow, 2003).

II.1.9.2 Bactérias patogênicas utilizadas para a entrega de vacinas de DNA

Atualmente, bactérias patogênicas intracelulares atenuadas têm sido utilizadas para a entrega de vetores de expressão eucariótica em células de mamíferos (Daudel *et al.*, 2007). Dentre estas, podemos citar *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* e *E. coli* (Schoen *et al.*, 2004). Contudo, esses organismos apresentam riscos de reversão da patogenicidade, não sendo totalmente seguros para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002). Assim, o uso das bactérias lácticas como um veículo para a entrega de plasmídeos vacinais representa uma alternativa atrativa em relação à patógenos atenuados (Wells e Mercenier, 2008).

II.2 Bactérias Lácticas

II.2.1 Características das Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas (BL) constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, microaerófilos, não formadores de esporos e não móveis, capazes de converterem açúcares (hexoses) em ácido láctico (Makarova e Koonin, 2007). Atualmente, cinco gêneros bacterianos entre cocos e bastonetes, com porcentagem de G+C no genoma inferior a 54%, compõe o grupo das BL: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Azevedo e Miyoshi, 2004).

As BL são um dos mais importantes grupos de bactérias utilizadas industrialmente. Estes organismos são usados em uma variedade de processos, incluindo produção alimentos, macromoléculas, enzimas e metabólitos (Pfeiler e Klaenhammer, 2007).

Por serem utilizadas há séculos em processos de fermentação e preservação de alimentos, a maior parte das BL são consideradas seguras (“GRAS” – “Generally Recognized As Safe”). Na indústria alimentícia, são utilizadas para a fermentação de alimentos e bebidas, formação do sabor (Urbach, 1995), preservação (Stiles, 1996), produção de suplementos ou aditivos (Hugenholtz *et al.*, 2002), bacteriocinas (De Vuyst e Leroy, 2007) e exopolissacarídeos (Cerning, 1990; Welman & Maddox 2003). As BL também podem ser utilizadas para a produção de consideráveis volumes de químicos, como ácido láctico (Kwon *et al.*, 2001), vitamina B (Burgess *et al.*, 2004; Taranto *et al.*, 2003) e açúcares de baixa caloria (Taguchi *et al.*, 2008).

A estes microrganismos ainda é dado um importante papel na manutenção da saúde e da prevenção de infecções (Reid *et al.*, 2003; Klaenhammer *et al.*, 2005), referidos como probióticos, ou seja, "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (Sanders, 2003). Alguns dos efeitos benéficos dos probióticos incluem exclusão de agentes patogênicos, imunomodulação de mucosas e redução de agentes cancerígenos (Reid *et al.*, 2003).

Em 2001, o primeiro genoma de uma BL (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403) foi seqüenciado e publicado (Bolotin *et al.*, 2001), sendo que mais de 25 genomas completos do grupo BL já foram seqüenciados, anotados e publicados, enquanto muitos projetos estão em andamento (Zhu, Zhang e Li, 2009). Num futuro próximo, o número de genomas das BL disponíveis será próximo de 100, o que representa um grande grupo de bactérias na genômica microbiana, quando comparados com ao número total de bactérias seqüenciadas (Zhu, Zhang e Li, 2009).

Recentemente, o potencial para as novas aplicações das BL, tais como vacinas orais (Steidler *et al.*, 2000), produção de proteínas heterólogas e metabólitos, vem sendo explorado por vários grupos de pesquisa. Neste contexto, estas bactérias são utilizadas

como “usinas celulares” para a produção de moléculas de interesse biotecnológico, como citocinas, enzimas, alérgenos e antígenos (Nouaille *et al.*, 2003; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2004) e também utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos na superfície de mucosas (Mercenier *et al.*, 2000).

II.2.2 *Lactococcus lactis*: a bactéria láctica modelo

Dentre todas as BL, *Lactococcus lactis* é a espécie mais bem caracterizada e figura como organismo modelo no estudo das mesmas; não só pela sua importância econômica, mas também devido ao fato de: (i) ser um microrganismo de fácil manipulação; (ii) ser “GRAS”; (iii) ter sido a primeira BL cujo genoma foi seqüenciado e (iv) possuir um grande número de ferramentas genéticas já desenvolvidas (Duwat *et al.*, 2000; Bolotin *et al.*, 2001; Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006), como protocolos de transformação, vetores de clonagem e seleção (Poquet *et al.*, 1998; Ravn *et al.*, 2000), além de não possuir o lipopolissacarídeo endotóxico LPS, por ser uma bactéria Gram-positiva (Bahey-El-Din e Gahan, 2010a).

Existem duas subespécies de *L. lactis*, *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris*, (Schleifer *et al.*, 1985). As duas subespécies têm sido intensamente estudadas, principalmente devido ao interesse industrial e por serem excelentes modelos para o estudo do metabolismo, fisiologia, genética e biologia molecular das BL (Bolotin *et al.*, 2001). Além disto, durante as duas últimas décadas, avanços significativos na área da genética e sistemas de expressão de proteínas em *L. lactis* (Nouaille *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2006) possibilitaram o aparecimento de novas áreas de aplicação desta bactéria, como a entrega de proteínas, genes, vacinas e drogas terapêuticas à superfície das mucosas pela via oral (Braat *et al.*, 2006; Hanniffy *et al.*, 2007; Bahey-El-Din *et al.*, 2010b).

II.2.3 Utilizações biotecnológicas de *Lactococcus lactis*

Dentre as aplicações extras alimentares vislumbradas para *L. lactis*, pode-se citar: (i) a produção de proteínas heterólogas de interesse biotecnológico em fermentadores ou diretamente nos alimentos e (ii) a construção de vacinas vivas de mucosas, seja como produtoras de proteínas diretamente no hospedeiro ou como um carreador para entrega de vacinas gênicas.

II.2.3.1 Produção de proteínas em *Lactococcus lactis*

A expressão de proteínas heterólogas em *L. lactis* foi alcançada tanto pelo desenvolvimento do conhecimento genético quanto pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular. Através deste dueto e a fim de obter níveis elevados e controlados de produção, vários vetores contendo promotores constitutivos ou indutivos foram desenvolvidos e hoje constituem a base de todos os sistemas de expressão voltados para *L. lactis* (Nouaille *et al.*, 2003).

Muitos sistemas de expressão vêm sendo desenvolvidos para a produção de proteínas recombinantes, sendo que dentre os sistemas procariotos, os mais altos níveis protéicos são obtidos utilizando *E. coli* (Jana e Deb, 2005). Entretanto, a estratégia de produção mais comumente utilizada neste microrganismo é a intracelular (periplasma ou citoplasma), o que envolve processos de purificação caros e, muitas vezes, problemáticos. Além disso, endotoxina ou lipopolissacarídeos (LPS) ainda devem ser retirados das proteínas a serem administradas em seres humanos (Morello *et al.*, 2008).

A bactéria *L. lactis* se destaca neste sentido como um microrganismo alternativo para a produção de moléculas de interesse biotecnológico em relação ao uso de modelos como *E. coli* e *Pichia pastoris*, sendo que inúmeras proteínas de origem eucariótica, bacteriana e viral já foram produzidas utilizando *L. lactis* como sistema de expressão (Nouaille *et al.*, 2003; Le Loir *et al.*, 2005).

L. lactis apresenta propriedades interessantes que a torna ideal para a produção de moléculas exógenas. *L. lactis* não produz endotoxinas ou LPS ou qualquer outro produto metabólico tóxico (Bolotin *et al.*, 2001), além de apresentar poucas proteínas secretadas, sendo que apenas uma, Usp45 (Unknown Secreted Protein of 45 kDa) é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) corado pela técnica “azul de Commassie” (van Asseldonk *et al.*, 1990), uma característica que facilita a purificação e análise das proteínas de interesse. Além disso, as linhagens utilizadas não possuem a protease extracelular PrtP (Gasson, 1983a) e são desprovidas de plasmídeos selvagens (linhagens IL1403 e MG1363) (Gasson, 1983b; Chopin *et al.*, 1984).

Vários sistemas de expressão e de endereçamento celular de proteínas heterólogas em diferentes localizações celulares já foram desenvolvidos não só para uso em *L. lactis*, mas também em outras BL (Norton *et al.*, 1995; Piard *et al.*, 1997; Dieye *et al.*, 2001; Le Loir *et al.*, 2001). Dentre os sistemas de expressão, pode-se destacar o sistema NICE (“Nisin Controlled Expression System”) e o sistema XIES (“Xylose-Inducible Expression System”) (de Vos & Gasson, 1989; Wells *et al.*, 1993a; de Vos, 1999; Miyoshi *et al.*, 2004).

II.2.3.2 *Lactococcus lactis* como vacinas vivas de mucosas

A microbiota do intestino humano é extraordinariamente complexa e é importante para a digestão, a proteção contra agentes patogênicos e principalmente na manutenção da imunidade de mucosas. As mucosas, como a gastrointestinal, são os locais onde o corpo entra em contacto com a maioria dos antígenos e agentes infecciosos, sendo que trato gastrointestinal produz de 70 a 85% das células imunes do corpo (Schroeter e Klaenhammer, 2009). Sendo assim, as mucosas representam a primeira linha de defesa contra os microrganismos que utilizam esse meio de entrada (Kagnoff e Eckmann, 1997; Izadpanah *et al.*, 2001).

Uma importante característica da resposta imune adaptativa das mucosas é a produção de anticorpos do tipo imunoglobulina A (IgA) por plasmócitos. A IgA é a principal classe de anticorpos que pode ser eficientemente secretada através dos epitélios e desempenha papel crítico, pois neutraliza a nocividade de organismos patogênicos (Macpherson *et al.*, 2001). Uma das funções exercidas por esses anticorpos é a capacidade de aprisionar microrganismos invasores no muco prevenindo o contato direto do patógeno com a superfície da mucosa (Lamm, 1997).

Recentemente, as BL, destacando-se *L. lactis*, vêm sendo utilizadas como veículo para a apresentação de antígenos exógenos na superfície de mucosas. Além do status “GRAS” algumas espécies desse grupo são capazes de aumentar a quantidade de IgA nas mucosas e estimular o sistema fagocítico do hospedeiro (Neutra e Kozlowski, 2006). As BL são também pouco imunogênicas, ao contrário dos microrganismos patogênicos e podem ser continuamente utilizadas em programas de imunização, além de não possuírem LPS em sua parede celular, o que elimina os riscos de choque por endotoxina (Mercenier *et al.*, 2000).

Vários trabalhos confirmam a capacidade de *L. lactis* em apresentar antígenos para a mucosa, gerando respostas imunes específicas (Chatel *et al.*, 2001). A maioria dos estudos sobre *L. lactis* como uma vacina viva foram feitos utilizando o TTFC (fragmento C da toxina tetânica), um antígeno altamente imunogênico, sendo verificado um aumento significativo nos níveis de IgA após a imunização oral dos camundongos com as linhagens recombinantes de *L. lactis* produtoras de TTFC (Norton *et al.*, 1995). Outros trabalhos mostraram que os animais vacinados com *L. lactis* produtora da forma intracelular do mesmo antígeno desenvolveram altos níveis de IgG e IgA específicos para TTFC. Posteriormente, esses animais tornaram-se resistentes ao desafio com a toxina tetânica (Wells *et al.*, 1993b; Robinson *et al.*, 1997).

Contudo, o maior desafio consiste principalmente na expressão de genes eucarióticos. O processamento pós-traducional em *L. lactis* algumas vezes não é certo, pois modificações tais como glicosilações e formação de pontes dissulfeto são limitadas devido à falta da enzima dissulfeto isomerase. Isto resulta em uma quantidade muito baixa da forma ativa da proteína de interesse, como observado com a IL-12 em *L. lactis* (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003a) e interferon omega ovino (Bermúdez-Humarán *et al.*, 2003b), devido a uma baixa taxa de formação passiva de pontes dissulfeto.

Uma estratégia para contornar o problema seria a utilização de bactérias para entregar plasmídios com cassetes de expressão eucariótica, onde as modificações pós-traducionais da proteína de interesse serão realizadas pelas células eucarióticas hospedeiras. Assim, a utilização das BL, destacando-se *L. lactis*, como um veículo para a entrega de plasmídeos de DNA poderia representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas de DNA.

II.2.3.3 *Lactococcus lactis* como carreador para vacinas gênicas

Guimarães *et al.* (2006) utilizaram *L. lactis* nativas para a entrega, em células de mamíferos, de um cassete de expressão eucariótica da proteína antigênica β -lactoglobulina bovina (BLG), a mais abundante proteína do soro do leite de vaca, considerada um alérgeno dominante. O co-cultivo da linhagem celular humana epitelial Caco-2 e *L. lactis* contendo o cassete BLG confirmou a capacidade de *L. lactis* na entrega do DNA em células de mamíferos, levando à expressão e secreção da proteína BLG por estas células. *L. lactis* nativas foram ainda capazes de entregar este cassete de expressão eucariótica a camundongos, *in vivo*, sendo a proteína BLG detectada na membrana epitelial do intestino delgado de 53% dos camundongos testados (Chatel *et al.*, 2008).

Uma nova estratégia é a utilização de linhagens recombinantes de *L. lactis* capazes de invadir e entregar plasmídeos vacinais para células epiteliais humanas. Após a invasão celular, *L. lactis* sofre lise e é provavelmente internalizado pelos vacúolos, liberado o DNA plasmidiano que pode ser transferido para o núcleo, resultando na expressão da ORF de interesse (Guimarães *et al.*, 2005). A proteína antigênica ou peptídeo de interesse expresso na célula infectada é apresentado ao sistema imune, ativando células T e B nos linfonodos (Reyes-Sandoval e Ertl, 2001).

Para o desenvolvimento desta nova estratégia, foi construída uma linhagem de *L. lactis* invasiva, expressando o gene da internalina A (*InIA*) de *Listeria monocytogenes* (Guimarães *et al.*, 2005). *InIA* codifica uma proteína de 84KDa que fica ancorada à parede celular, mediando a entrada deste patógeno em células epiteliais de mamíferos por se ligar

à E-caderinas presentes nas mesmas (Gaillard *et al.*, 1991; Lebrun *et al.*, 1996). Foi demonstrado que a proteína InIA foi eficientemente ancorada ao envelope celular em *L. lactis*, promovendo sua internalização por células humanas epiteliais, *in vitro*, e por enterócitos, *in vivo*, após administração oral em porcos-da-índia. Além disso, essa internalização promoveu a entrega de plasmídeos contendo a ORF da Proteína Verde Fluorescente (GFP) funcional em cerca de 1% das células de mamíferos, *in vitro*, levando à produção da mesma nos animais. Esses resultados foram obtidos a partir da utilização de um plasmídeo com cerca de 10 Kpb, o qual é fruto da cointegração de dois replicons: um de *E. coli* e outro de *L. lactis* (Guimarães *et al.*, 2005).

Entretanto, após diversas tentativas de se clonar ORFs codificadoras de antígenos nesse plasmídeo, foi verificado que sua estrutura e tamanho tornavam os procedimentos de clonagem e transformação muito difíceis (Guimarães *et al.*, 2005). Dessa maneira, para melhorar as estratégias de entrega do vetor, um novo plasmídeo chamado pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria), de menor tamanho (3742 pb), foi construído. O pValac foi formado pela fusão do (i) promotor do citomegalovirus (CMV) que permite a expressão do antígeno em células eucarióticas, (ii) sítio de clonagem múltipla, (iii) seqüência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento (BGH poli-A) para estabilizar o transcrito de RNA mensageiro, (iii) origens de replicação que permitem a propagação do plasmídeo tanto em *E. coli* quanto em *L. lactis*, e (iv) um gene de resistência ao cloranfenicol para a seleção das linhagens recombinantes (Guimarães *et al.*, 2009).

Embora atraente, a utilização experimental de *L. lactis* expressando InIA em camundongos tem uma grande limitação: InIA não interage com a E-caderina murina. Assim, a estratégia de se utilizar *L. lactis* InIA como um veículo para a entrega de DNA só pode ser testado em cobaias que expressem a E-caderina humana, como porcos da Índia, ou em camundongos transgênicos (Lecuit *et al.*, 2001), o que dificulta em muito os testes, *in vivo*.

Assim, uma nova linhagem recombinante de *L. lactis*, expressando a proteína de ligação Fibronectina A (FnBPA) de *Staphylococcus aureus* (Que *et al.*, 2001), foi testada com o objetivo de melhorar e facilitar a entrega do DNA à células de mamíferos (Innocentin *et al.*, 2009). FnBPA medeia a adesão da bactéria ao tecido hospedeiro e sua entrada em células não fagocíticas (Sinha *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a capacidade invasiva de *L. lactis* expressando FnBPA é comparável à observada em *L. lactis* expressando InIA, utilizando-se a linhagem celular humana epitelial Caco-2, onde grandes agrupamentos de *L. lactis* expressando FnBPA foram visualizados dentro das células Caco-2 através de microscopia de fluorescência e microscopia confocal (Innocentin *et al.*, 2009). A linhagem invasiva foi ainda transformada com o plasmídeo pValac:*gfp* para avaliação de sua capacidade de entrega, *in vitro*, do plasmídeo de expressão eucariótica funcional. Assim, por citometria de fluxo foi demonstrado que uma grande porcentagem de células fluorescentes

ocorreu após 3 horas de co-cultivo com a linhagem *L. lactis* FnBPA(pValac:gfp) (Innocentin *et al.*, 2009).

Enfim, estas estratégias combinam as vantagens da imunidade de mucosas com a simplicidade da técnica e o baixo custo da vacina de DNA, além da segurança de utilização destas bactérias que são consideradas não patogênicas (Guimarães *et al.*, 2005).

Nesse contexto, a utilização de uma linhagem invasiva de *L. lactis* para a entrega de um plasmídeo de expressão eucariótica expressando um antígeno de interesse poderia representar uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacinas de DNA, mais seguras, mais eficazes e econômicas, para o controle de diversas doenças infecciosas, como, por exemplo, a tuberculose.

II.3 Tuberculose

II.3.1 Considerações gerais

Desde a antiguidade, a Tuberculose (TB) é uma doença que aflige a humanidade. O agente causador da doença, conhecido como *Mycobacterium tuberculosis*, foi isolado pela primeira vez em 1882. Cento e vinte oito anos após esta descoberta, um terço da população mundial (aproximadamente 2 bilhões de pessoas) ainda se encontra infectada com *M. tuberculosis* em estado latente, sendo que 10% destas desenvolvem a TB ativa durante a vida (Pieters, 2008), fato que torna esta doença um dos principais problemas sociais, econômicos e de saúde pública no mundo (Lugo e Bewley, 2008).

A estimativa da Organização Mundial de Saúde é que mais de oito milhões de pessoas contraiam e aproximadamente dois milhões morram de TB por ano no mundo (WHO, 2006). A TB é uma doença infecto-contagiosa que está intimamente associada à pobreza, ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento, e que tem sido exacerbada, desde os anos 80, pela epidemia do HIV (McShane, 2005; Derrick e Morris, 2007).

M. tuberculosis pertence à família Mycobacteriaceae, sendo o principal agente etiológico da TB humana (Pfyffer *et al.*, 1998; Barrera, 2007). É necessário recorrer à técnica de coloração especial (Ziehl-Neelsen) para a visualização das células de *M. tuberculosis*, pois a coloração pela técnica de Gram é ineficaz devido aos ácidos micólicos presentes na parede celular desse bacilo (Holt *et al.*, 1994).

Desde o seu isolamento em 1905, a linhagem *M. tuberculosis* H37Rv tem sido aplicada mundialmente em pesquisas, pelo fato de manter plena virulência em modelos animais de TB ao contrário de alguns isolados clínicos e por ser suscetível às drogas e ser propício à manipulação genética. A sequência completa e a anotação do genoma desta

linhagem foram publicados em 1998 (Cole *et al.*, 1998) e re-anotado em 2002 (Camus *et al.*, 2002).

A quimioterapia padrão contra a TB consiste em dois meses de tratamento com a administração das drogas anti-TB de primeira geração (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol), seguida por outra fase com a administração de isoniazida e rifampicina por mais quatro meses, totalizando seis meses de tratamento (Who, 2005). Entretanto, dificuldades ao tratamento e ao controle da TB é a ocorrência de linhagens de *M. tuberculosis* multidrogas resistentes (MDR-TB) e extensivamente droga-resistentes (XDR-TB) (Gandh *et al.*, 2006). Aliado a isso, o longo período de tratamento exigido acaba resultando no abandono do mesmo, tendo reflexos importantes no controle da doença e no aparecimento de bacilos resistentes (Silva, 1999; Zhang, 2005).

Assim, a prevenção da TB se torna importantíssima, sendo a BCG a única vacina disponível para uso clínico. A primeira vacinação utilizando BCG foi realizada em 1921, em Paris, e no Brasil os programas de imunização com a vacina iniciaram em 1927 (Hijjar *et al.*, 2007). Estima-se hoje que cerca de 3 bilhões de pessoas já tenham sido vacinadas com a BCG, o que torna esta a vacina a mais amplamente utilizada no mundo (Martin, 2005; Dietrich, Weldingh e Andersen, 2006).

Embora venha sendo amplamente utilizada no Brasil e em outros países, a eficácia da vacina BCG permanece controversa. Verificou-se que a vacina é capaz de proteger crianças com uma eficácia maior que 80% contra as formas mais severas de TB, incluindo a meningite tuberculosa e a TB miliar (Trunz *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009). Em contraste, a eficácia da vacina contra a TB pulmonar em pacientes adolescentes e adultos varia de 0 a 80%, dependendo da população estudada (Brewer, 2000; Britton e Palendira, 2003; Liu *et al.*, 2009). Apesar de controverso, tem sido estimado que o efeito da vacinação com BCG não é mais significativa após 10 anos da imunização (Sterne, Rodrigues e Guedes, 1998).

Diante dos motivos expostos acima, faz-se necessária pesquisa e o desenvolvimento de novas vacinas contra a TB, mais seguras, eficazes e sem efeitos colaterais, especialmente para indivíduos imunocomprometidos. Além disso, a criação de uma nova vacina que possa aumentar a imunidade de indivíduos já vacinados com a BCG certamente é uma das intervenções que poderiam ter um grande impacto sobre o número de novos casos de TB na população adulta mundial (Dietrich, Weldingh e Andersen, 2006).

II.3.2 Vacinas contra a tuberculose

Em 1991, Andersen e colaboradores observaram que o sobrenadante na fase inicial de crescimento da cultura de *M. tuberculosis* apresentava diversos antígenos secretados

com grande potencial imunogênico (Andersen *et al.* 1991). Com isto, a demonstração de que vacinas baseadas em proteínas secretadas poderiam proteger eficazmente contra a TB levou ao início de extensos programas para a descoberta de novos antígenos, sendo que, atualmente, diversos destes estão sendo testados para a criação de novas vacinas contra a TB.

Exemplos de proteínas secretadas por *M. tuberculosis* são as proteínas Ag85B, TB10.4, ESAT-6, Mtb32 e Mtb39, sendo que frações purificadas de algumas dessas proteínas têm sido utilizadas em ensaios de imunização e têm se mostrado eficazes em gerar uma resposta imune efetiva contra a TB (Olsen *et al.*, 2004; Kamath *et al.*, 2008).

Assim, nos últimos anos, o grande esforço internacional para o controle da TB resultou em mais de 200 candidatos à vacina contra a TB, testados em camundongos, porcos da Índia e primatas (Ginsberg, 2002; Orme, 2005; Izzo *et al.*, 2005). Dentre elas estão as vacinas baseadas em linhagens de micobactérias atenuadas ou inativadas, as vacinas de subunidade ou protéicas, as vacinas baseadas em microrganismos vivos recombinantes e as vacinas gênicas. Muitas dessas vacinas se encontram em fase de ensaio clínico (Ginsberg, 2002; Reed e Lobet, 2005).

II.3.3 A família ESAT-6

ESAT-6 (“6-kDa Early Secreted Antigenic Target”), uma proteína de 95 aminoácidos (aa) e peso molecular de 6 kDa (Sorensen *et al.*, 1995; Berthet *et al.*, 1998), está localizada na denominada região de diferença 1 (RD1), região genômica que está ausente em todas as linhagens atenuadas de *M. tuberculosis* (Brodin *et al.*, 2002), como em *M. bovis* (BCG), mas presente e expresso em todas as linhagens virulentas de *M. tuberculosis*; o que evidencia o papel chave que este antígeno desempenha na virulência deste patógeno (Gordon *et al.*, 1999; Behr *et al.*, 1999, Pym *et al.*, 2002). Assim, esta região representa um dos mais interessantes loci genômicos destas bactérias, por estar envolvida simultaneamente na virulência e na imunidade da doença (Brodin *et al.*, 2004).

A análise da seqüência genômica de *M. tuberculosis* tornou evidente que ESAT-6 foi o protótipo de uma grande família de proteínas relacionadas, composta por 23 membros na linhagem de *M. tuberculosis* H37Rv, localizados em 11 loci genômicos diferentes, sendo seus genes nomeados geneticamente de *esxA-W*, com *esxA* codificando ESAT-6 e *esxB* codificando CFP-10 (“10-kDa Culture Eluate Protein”) (Cole *et al.*, 1998; Brodin *et al.*, 2004). O heterodímero de ESAT-6 e CFP-10 é secretado provavelmente de forma Sec-independente (Cole *et al.*, 1998) por um sistema chamado de sistema de secreção do tipo 1 de ESAT-6 (ESX-1) (Brodin *et al.*, 2004).

II.3.4 ESAT-6 como um antígeno vacinal

Dada à dimensão global da TB, a vacinação não é apenas uma prioridade, mas continua a ser a única intervenção realista da saúde pública que é capaz de interferir tanto na incidência quanto na prevalência da doença. A identificação de ESAT-6 como um antígeno imunodominante para células T nos primeiros estágios da infecção (Andersen *et al.*, 1995; Sorensen *et al.*, 1995) levou a uma investigação mais detalhada do seu papel na imunidade da TB. Em cinco de seis linhagens geneticamente diferentes de camundongos, células T específicas para ESAT-6 constituíram de 25 a 35% de tais células recrutadas na primeira fase da doença (Brandt *et al.*, 1996). Do mesmo modo, na primeira fase da infecção em seres humanos (Ravn *et al.*, 1999), gado (Pollock e Andersen *et al.*, 1997) e porcos da Índia (Elhay *et al.*, 1998), ESAT-6 foi um importante alvo para a resposta de células T. Em um estudo utilizando ELISPOT (“Enzyme-Linked Immunosorbent Spot”), respostas a ESAT-6 foram encontradas em 96% dos pacientes com a doença; o que representa uma frequência de reconhecimento não encontrada antes com qualquer outro antígeno sozinho (Lalvani *et al.*, 2001). Além disso, uma forte resposta com anticorpos para ESAT-6 foi encontrada em indivíduos infectados com a TB (Lyashchenko *et al.*, 1998a), em primatas não-humanos (Brusasca *et al.*, 2003) e bovinos (Lyashchenko *et al.*, 1998b).

II.3.4.1 Vacinas em desenvolvimento utilizando ESAT-6

Diversos estudos para a criação de novas vacinas contra a TB foram realizados utilizando-se ESAT-6. Foi demonstrado que ESAT-6 pode induzir proteção imunológica como uma vacina de DNA ou como vacina de subunidade (Kamath *et al.*, 1999, Li *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2006), induzindo resposta imune seja sozinho (Xu *et al.*, 2008) ou em combinação ou fusão com outros antígenos de *M. tuberculosis*, como Ag85B (Olsen *et al.*, 2001; Carpenter *et al.*, 2005; Chang-hong *et al.*, 2008; Dissel *et al.*, 2010). Epítopos de ESAT-6 combinados a epítopos de outros antígenos de *M. tuberculosis* também vem sendo utilizados como vacina de DNA, levando a efeitos protetores equivalentes e até superiores a vacinação somente com a BCG (Gao *et al.*, 2009a; Gao *et al.*, 2009b). Além disto, a proteína ESAT-6 vem sendo utilizada como um reforço (boost) para a vacina BCG (prime) (Dietrich *et al.*, 2007) e também no desenvolvimento de BCG e outras bactérias recombinantes (Hall *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010).

Vacinas de DNA

A vacina de DNA codificando ESAT-6 e o Flt3 ligante, um fator de crescimento de células dendríticas, induziu maior resposta tipo TH1 em camundongos, comparando-se com os controles imunizados com PBS (“Phosphate Buffered Saline”), vetor sem ESAT-6 e BCG, além de níveis mais elevados de proliferação de linfócitos e produção elevada de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ e IL-2) por células do baço, bem como o aumento de anticorpos específicos no soro, e menores níveis de citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) (Xu *et al.*, 2008).

A proteína de fusão Ag85B/ESAT6 como vacina de DNA pode induzir altos níveis de anticorpos específicos IgG2a em camundongos, levando também a proliferação de linfócitos específicos para Ag85B e ESAT6 no baço, além da produção de altos níveis de IFN- γ e IL-2, semelhante à resposta provocada pela BCG. Esta vacina de DNA levou a significativa proteção contra o desafio com *M. tuberculosis* H37Rv, com redução no número de unidades formadoras de colônia da bactéria no baço e pulmão, enquanto que no grupo controle, estes órgãos foram seriamente danificados (Chang-hong *et al.*, 2008). Em outro trabalho, a imunização intramuscular com três plasmídeos, para a expressão de MPT64, Ag85B e ESAT-6, separadamente, levou a um melhor grau de proteção contra a TB em camundongos desafiados com *M. tuberculosis*, comparando-se aos imunizados com apenas um plasmídeo (Kamath *et al.*, 1999).

Vacinas de DNA vêm sendo criadas a partir de subsequências de proteínas (epítomos) selecionadas com padrões de aminoácidos que permitem ligação às moléculas de MHC humana, resultando em uma vacina de DNA múltiplo-epítomos (ECANS - Epitopes Casted in a Natural Structure). Epítomos dos principais antígenos de *M. tuberculosis* (ESAT-6, Ag85A, CFP-10 e Ag85B) foram clonados no domínio intermediário de HSP65 para a imunização de camundongos, resultando em uma resposta imune celular específica: aumento significativo da proliferação de linfócitos específicos, na secreção de IFN- γ e na atividade de linfócitos T citotóxicos, em relação aos animais que foram vacinadas somente com a BCG (Gao *et al.*, 2009b). Em outros estudos, os mesmos epítomos também levaram a maiores níveis da citocina IL-12 e aumento na relação IgG2a/IgG1, indicando uma resposta imune predominantemente tipo Th1 ativada por pECANS (Gao *et al.*, 2009a).

A combinação da vacina de DNA codificando ESAT-6 com a BCG também resultou em maior proteção em relação à BCG sozinha, levando a uma forte resposta de células T, produção de maiores níveis de IFN- γ , levando a diminuição de bactérias no pulmão e baço e redução da histopatologia pulmonar (Fan *et al.*, 2007).

Camundongos vacinados em um regime *DNA prime-protein boosting*, utilizando-se ESAT-6 como antígeno nos dois casos, tiveram a resposta celular (TH1 e TH2) e humoral significativamente aumentadas em comparação a vacina de DNA ou proteína ESAT-6 em

separado, além de aumento na produção de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ), aumento na proporção relativa de IgG2a/IgG1 e aumento de células T citotóxicas (Wang *et al.*, 2004).

Porém a via de imunização utilizadas nos trabalhos acima são majoritariamente intramuscular (Kamath *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2007; Chang-hong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2009a; Gao *et al.*, 2009b), a qual é uma rota de administração pouco eficiente em estimular a imunidade de mucosas. Este tipo de estimulação é importantíssimo para a proteção contra a TB, visto que esta é a primeira superfície a entrar em contato com o patógeno. Além disto, as vacinas administradas por via intramuscular requerem adjuvantes, pois as que utilizam DNA não necessitam de múltiplas doses de grandes quantidades de plasmídeo para a geração de resposta e proteção adequada (Lowrie *et al.*, 1997).

Assim, devido à necessidade do desenvolvimento de vacinas contra a TB que ativem uma resposta imune completa, incluindo imunidade de mucosas, Wang *et al.* (2009) utilizaram uma linhagem patogênica atenuada de *Salmonella typhimurium* como um veículo para a entrega da vacina de DNA com a proteína de fusão ESAT6-Ag85B (SL(E6-85B)). Os dados experimentais demonstraram que esta vacina de DNA induziu a uma forte resposta imune específica de mucosa, além da humoral e celular. Após o desafio de camundongos com *M. tuberculosis* H37Rv, foi verificado que SL(E6-85B) foi tão eficiente quanto a BCG no controle da TB, porém SL(E6-85B) combinada com BCG foi ainda mais eficaz, resultando em maior controle do crescimento bacteriano, menor inflamação e melhoria global na resposta imune. Contudo, bactérias patogênicas apresentam riscos de reversão, não sendo totalmente seguras para uso humano, especialmente em crianças e pacientes imunocomprometidos (Dunham, 2002).

III. OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo Geral

- Construir e avaliar a funcionalidade de um plasmídeo vacinal para a expressão do antígeno ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* em células mamíferas, utilizando uma bactéria láctica invasiva como veículo carreador.

III. 2 Objetivos específicos

- Isolar a ORF do antígeno ESAT-6 de *M. tuberculosis*;
- Clonar a ORF ESAT-6 no vetor pValac;
- Transfectar células de mamíferos da linhagem Flp-InTM-CHO com o plasmídeo pValac:ESAT-6;
- Verificar a funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 em células mamíferas, *in vitro*, transfectadas com o mesmo através de RT-PCR;
- Verificar a capacidade de produção da proteína ESAT-6 pelas células transfectadas com pValac:ESAT-6 por *Western Blotting*;
- Verificar a capacidade de produção da proteína ESAT-6 pelas células transfectadas com pValac:ESAT-6 através de Imunocitoquímica;
- Transformar *L. lactis* FnBPA com o plasmídeo pValac:ESAT-6.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem

As linhagens bacterianas empregadas neste trabalho estão listadas na Tabela 2 e os plasmídeos utilizados na Tabela 3 e Figura 4. O meio de cultivo utilizado para o crescimento de *L. lactis* foi o BHI (“Brain Heart Infusion”), e quando necessário 5 µg/mL do antibiótico eritromicina (Sigma) foram adicionados ao meio. As linhagens foram crescidas a 30°C sem agitação. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado aos meios citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis*, foram cultivadas em meio líquido por um período de 18 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas (1:4) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani) e quando necessário, o meio foi suplementado com 10 µg/mL do antibiótico clorafenicol (Cm) (*E. coli* pValac), ou 50 µg/mL do antibiótico canamicina (Km) (*E. coli* pTOPO), ou 100 µg/mL do antibiótico ampicilina (Amp) (*E. coli* pUC18 ou pUC19). As linhagens foram crescidas à 37°C sob agitação. Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico (Difco) foi adicionado aos meios citados. Para fins de estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio líquido por um período de 18 horas e em seguida, as culturas foram diluídas (1:1) em uma solução estéril de glicerol 80% e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

Meios e Soluções:

Luria-Bertani (LB): 25 g do meio LB (Accumedia®) foram pesados na balança analítica e em seguida foi acrescentada água destilada, completando-se o volume para 1 L. Para o preparo de meio sólido, 1 L do meio LB líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Difco). Posteriormente, o meio foi esterelizado durante 15 minutos a 121°C e distribuído em placas de petri. Composição do meio: digestão enzimática de caseína 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,3 ± 2, a 25°C (Accumedia®).

Brain Heart Infusion (BHI): 37 g do meio BHI (Himedia®) foram pesados na balança analítica e em seguida foi acrescentada água destilada, completando-se o volume pra 1 L. Para o preparo de meio sólido, 1 L do meio BHI líquido foi acrescido de 15 g de ágar bacteriológico (Difco). Posteriormente, o meio foi esterelizado durante 15 minutos a 121°C e distribuído em placas de petri. Composição do meio: infusão de cérebro de bezerro 200 g/L;

infusão de coração 250 g/L; peptona 10 g/L; dextrose 2 g/L; cloreto de sódio 5 g/L; fosfato dissódico 2,5 g/L; pH 7,4 ± 2, a 25°C (Himedia[®]).

Cloranfenicol (10 mg/mL): 100 mg de Cloranfenicol (Sigma) foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico PA (Merck) e a solução foi esterelizada, com o auxílio de um filtro 0,22 µm (Corning), em capela de fluxo laminar (Pachane).

Eritromicina (50 mg/mL): 500 mg de Eritromicina foram dissolvidos em 10 mL de álcool etílico PA (Merck) e a solução foi esterelizada, com auxílio de um filtro 0,22 µm (Corning), em capela de fluxo laminar (Pachane).

Canamicina (100 mg/mL): 1000 mg de Canamicina foram dissolvidos em 10 mL de água MiliQ (Merck) e a solução foi esterelizada, com auxílio de um filtro 0,22 µm (Corning), em capela de fluxo laminar (Pachane).

Ampicilina (100 mg/mL): 1000 mg de Ampicilina foram dissolvidos em 10 mL de água MiliQ (Merck) e a solução foi esterelizada, com auxílio de um filtro 0,22 µm (Corning), em capela de fluxo laminar (Pachane).

Glicerol (80%): 80 mL de glicerina foram dissolvidos em de água Milli-Q, completando-se o volume para 100 mL. Em seguida, a solução foi esterelizada, por autoclavação, a 121°C por 15 minutos. alíquotada e estocada a 4°C.

Tabela 2: Linhagens bacterianas

Linhagem	Características	Fonte
<i>Lactococcus lactis</i> (MG1363) FnBPA	(fnbA/Ery ^r) ^a	Que <i>et al.</i> , 2001
<i>Escherichia coli</i> (TG1) pValac:gfp	(GFP; Cm ^r) ^b	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
<i>Escherichia coli</i> TOP10	(hsdR; mcrA; lacZΔM15; endA1; recA1)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> TG1	[supE, hsd, Δ5, thi, Δlac-proAB), F'(traD36 proAB-lacZΔ M15)]	Invitrogen

^{a/b}: Linhagens de *L. lactis* e *E. coli* pertencentes ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) da Universidade Federal de Minas Gerais em colaboração com o grupo do Dr. Philippe Langella do Instituto Nacional de Pesquisas Agronômicas (INRA, França).

Tabela 3: Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Características relevantes	Fonte
Zero Blunt® TOPO®	Vetor de clonagem: (P _{lac} ; lacZα; ccdB; Km ^r ; Zeo ^r ; pUC ori;) ^a	Invitrogen
pValac	Vetor de expressão eucariótica: (pCMV/ Cm ^R / RepA/RepC) ^b	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
pValac: <i>gfp</i>	(pCMV/Cm ^R /RepA/RepC/ <i>gfp</i>) ^c	Guimarães <i>et al.</i> , 2009
pOri23- <i>fnbA</i>	<i>Shuttle</i> vetor: (<i>fnbA</i> /ori ColE1/P23/Ery ^R) ^d	Que <i>et al.</i> , 2001
pValac: <i>ESAT-6</i>	(pCMV/ Cm ^R / RepA/RepC/ ESAT-6) ^e	Este trabalho

^a: P_{lac}: promotor do operon lac; Km^r: gene que confere resistência à canamicina; pUc ori: origem de replicação; ccdB: gene letal; Zeo^R: gene de resistência a zeomicina;.

^{b/c/e}: pValac: Vaccination using Lactic acid bacteria; pCMV: promotor do citomegalovirus; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cm^R: gene de resistência ao cloranfenicol; *gfp*: ORF do gene codificador da proteína verde fluorescente; ESAT-6: ORF do gene codificador da proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*.

^d: Plasmídeo contendo o gene codificador da proteína FnBPA de *Staphylococcus aureus*; Ery^R resistência a Eritromicina; ori ColE1: origem de replicação; P23: promotor cromossômico de *L. lactis* 1363.

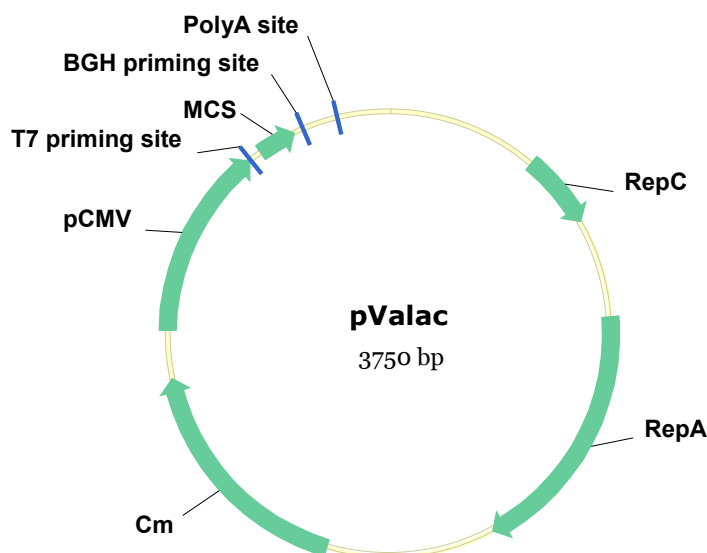


Figura 4: Representação do vetor de expressão eucariótica pValac (Vaccination using Lactic acid bacteria) - pCMV: promotor do citomegalovirus; MCS: sítio de clonagem múltipla; BGH priming site e T7 priming site: primer para amplificação e/ou sequenciamento do inserto; polyA site: seqüência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cm: gene de resistência ao cloranfenicol

IV.2 Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmidiano foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook, Fritsch e Maniatis, 1989), com algumas modificações (especificadas junto aos métodos), e/ou segundo a recomendação do fabricante dos *kits*. A qualidade do material obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através da resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e também por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações do fabricante. As seqüências nucleotídicas dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento (Sanger *et al.*, 1977).

IV.3 Resolução Eletroforética

Todas as amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose a 1%, assim como segue. Ao DNA, foi adicionado tampão de amostra 5X e o mesmo foi resolvido em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 100 V durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado em fotodocumentador, onde o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm, através do sistema de documentação fotográfica “Kodak Digital Science TM DC40 Camera” (Kodak). A foto foi processada pelo programa “Electrophoresis Documentation and Analysis System” (Kodak). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de DNA de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Soluções

Brometo de etídeo: Solução estoque a 5 mg/mL; Utilizou-se a 0,5 µg/mL.

TBE (10X): 54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0 - 8,5); água destilada q.s.p. 1L.

Tampão de amostra: Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X.

IV.4 Amplificação da ORF ESAT-6

A amplificação, por PCR (“Polymerase Chain Reaction”), do fragmento de DNA de 300 pb, contendo a seqüência codificadora do gene ESAT-6, foi realizada a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* linhagem H37Rv (Genbank accession number AL123456). Para isto, dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados de forma complementar a seqüência codificadora do gene ESAT-6, contendo ainda um sítio artificial de restrição em cada extremidade (*Bam*HI e *Eco*RI) e a seqüência de Kozak iniciando a ORF ESAT-6 no primer *Foward* (Tabela 4).

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 5 µL tampão de amplificação Pfx 10X (Invitrogen), 1,5 µL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 2 µL de MgSO₄ 50 mM (Invitrogen), 1 µL do primer foward e 1 µL do primer reverse, ambos a 100 pMoles/µL, 0,5 µL do DNA total de *M. tuberculosis* (100 ng/µL), 1 µL da enzima DNA polimerase Pfx Platinum® 2,5 u/µL (Invitrogen) e 39 µL de água miliQ estéril. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 29 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos primers a 62°C por 30 segundos; extensão a 68°C durante 1 minuto; e extensão final por 7 minutos a 68°C. A reação ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). As seqüências dos iniciadores, dos sítios de restrição e o tamanho do fragmento amplificado encontram-se na tabela 4.

O volume total da reação de PCR, acima descrita, foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1%. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes ao amplicon ESAT-6 (300 pb), foram purificados com o Kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA purificado foi então estimada através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e a leitura realizada em espectrofotômetro.

Tabela 4: Primers utilizados na PCR da ORF ESAT-6.

Iniciador “forward” de ESAT-6 Sítio de restrição para a enzima <i>Bam</i> HI está sublinhado e Sequência de Kozak marcada	5’ – <u>GGATCCACCATGG</u> GAGCAGCAGTGGAAATTCGCG – 3’
Iniciador “reverse” de ESAT-6 Sítio de restrição para a enzima <i>Eco</i> RI está sublinhado	5’ – <u>GAATTC</u> CTATGCGAACATCCCAGTGACG – 3’
Tamanho do fragmento amplificado	300 pb

IV.5 Clonagem da ORF ESAT-6 no sistema TOPO

IV.5.1 Confeção de *Escherichia coli* eletrocompetente

100 µL de uma cultura de *E. coli* TOP10 ou TG1 (Tabela 2), contendo aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC), foram inoculados em 5 mL de meio LB, sem antibiótico, e incubados a 37°C, durante 18 horas sob agitação. Em seguida, uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançada a DO desejada, a cultura foi resfriada, em gelo, por 30 minutos e redistribuída em seis tubos falcon com 40 mL de cultura em cada. Posteriormente, cada cultura foi centrifugada a 4.000 rpm (Rotações por Minuto) durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Assim, para a lavagem do precipitado celular, a cada tubo foram adicionados 40 mL de uma solução, estéril e gelada, de glicerol 10% e as células foram ressuspensas. Os tubos foram novamente centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado.

Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e, após a última lavagem, o precipitado celular unificado foi ressuspenso em 1 mL da solução de glicerol 10% e alíquotas de 100 µL foram estocadas a -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota (100 µL) com células eletrocompetentes, congelada a -70°C, foi colocada no gelo durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 10 ng do plasmídeo pUC18 ou pUC19 (Amp^r) e a mistura foi incubada por 10

minutos no gelo. Em seguida a mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (2 mm) (BioAgency), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 250 V, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω utilizando-se um eletroporador GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio LB a 37°C e incubadas a 37°C em Banho Maria, sem agitação, por duas horas. Diluições de 10^{-2} , 10^{-4} e 10^{-6} foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas a 37°C durante 18 horas.

IV.5.2 Transformação de *Escherichia coli* TOP10

O amplicon purificado e correspondente à ORF ESAT-6 foi submetido a uma reação de ligação no vetor Zero Blunt® TOPO® (Figura 5) (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen) para a geração do plasmídeo intermediário pTP:ESAT-6. A ligação foi realizada conforme as instruções do fabricante. O produto de ligação (pCR®-Blunt II-TOPO® e inserto ESAT-6) foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 preparadas de acordo com o protocolo descrito no item IV.5.1, com eficiência de 1×10^7 UFC por micrograma de DNA.

A transformação foi conduzida por eletroporação seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item IV.5.1. Para tanto, uma alíquota (6 μ L) do produto de ligação foi misturada com 100 μ L de células eletrocompetentes e incubados no gelo por 10 minutos. A eletroporação foi realizada no aparelho GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). Para o controle negativo, 100 μ L de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.

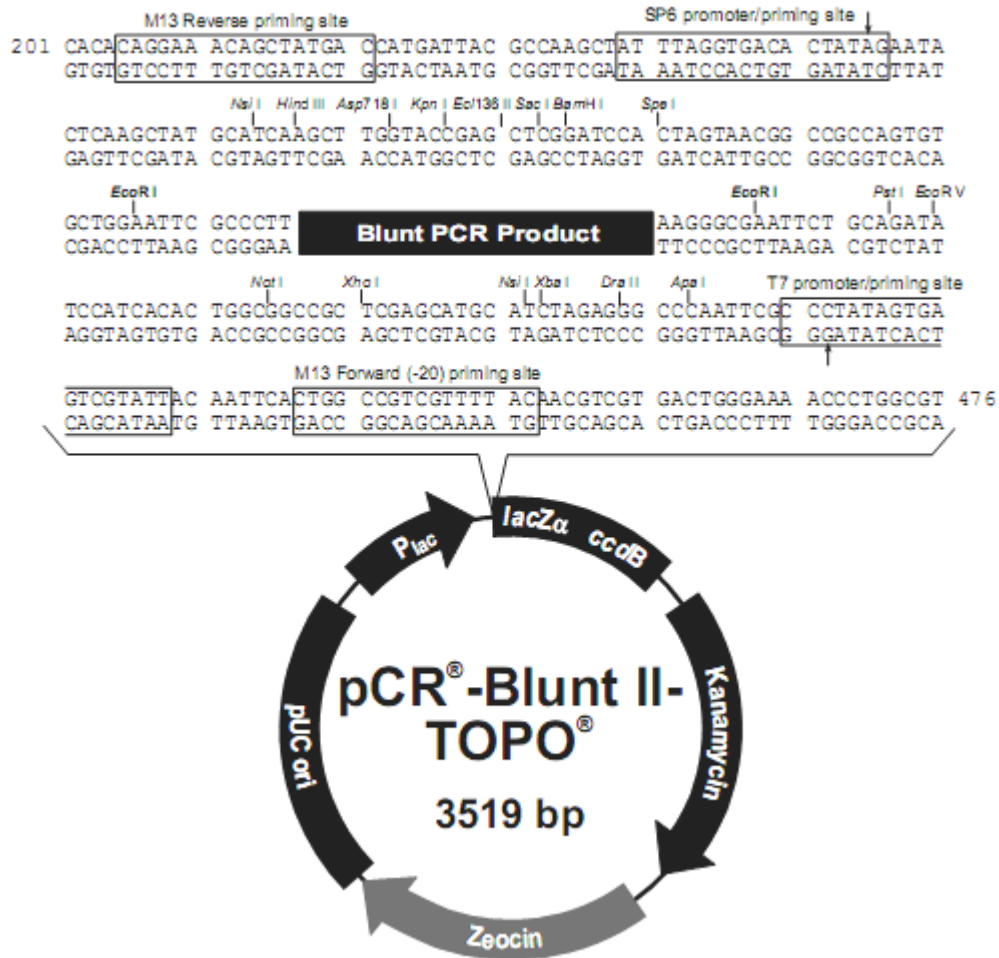


Figura 5: Representação esquemática do vetor Zero Blunt® TOPO®, destacando-se o sítio de clonagem múltipla do mesmo. Os sítios das respectivas endonucleases de restrição estão indicados no local da clivagem. As setas indicam o início da transcrição para T7 e SP6 polimerases. A sequência de anelamento dos primers M13 Foward e Reverse, utilizados para o sequênciamnto do produto da PCR (inserto), estão destacados na figura (Fonte: User Manual Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen).

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 50 μ L, 100 μ L e o restante (850 μ L centrifugados), da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 50 μ g/mL de canamicina. As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes à Km. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a extração de plasmídeos e confirmar a presença do inserto ESAT-6 nos mesmos.

IV.5.3 Extração do DNA plasmidiano de *Escherichia coli* TOP10

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo Km 50 μ L/mL e mantidos, por cerca de 18 horas, a 37°C sob agitação. Uma alíquota de 1 mL de cada

cultura foi estocada em freezer a -80°C utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante do inóculo foi transferido para tubos de microcentrifuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos com o kit *Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), conforme recomendações do fabricante ou pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações, como segue: 4 μL de inóculo crescido por aproximadamente 18 horas a 37°C foram centrifugados por 7 minutos a 13.000 rpm e o precipitado celular coletado e ressuspenso em 200 μL da solução I. Após cinco minutos, 400 μL da solução II foram acrescentadas à mistura anterior. Após 2 minutos foram adicionados 100 μL de clorofórmio e, logo em seguida, 300 μL da solução III. A mistura foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (cerca de 500 μL) foi coletado em novos tubos onde foi feita a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto, 10% de Acetato de Sódio (3 M) e 1% de Glicogênio (20 mg/mL). Os tubos foram então incubados por aproximadamente 30 minutos em freezer -80°C . Após esse período, foram centrifugados por 15 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. Após lavagem com etanol 70% (1 mL), o precipitado foi ressuspenso em 20 μL de água milli-Q estéril. Quando necessário, o DNA foi tratado com 1 μL de RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em Banho Maria a 37°C por uma hora. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo os mesmos parâmetros já descritos no item IV.3

Soluções:

Solução I (Ressuspenção): Sacarose ou glicose 50 mM (1 mL); Tris-HCl 25 mM pH 8.0 (0,25 mL); EDTA 10 mM pH 8.0 (0,2 mL); água destilada q.s.p. 10 ml

Solução II (Lise): NaOH 0,2 N (200 μL); SDS 1% (250 μL); água destilada q.s.p. 5 mL

Solução III (Neutralização): acetato de potássio 5 M (60 mL); ácido acético glacial (11,5 mL); água destilada q.s.p. 100 mL.

Glicogênio (20 mg/mL): 100 mg de glicogênio dissolvidos em 5 mL de água Milli-Q.

Acetato de Sódio (3M): 246 g acetato de sódio dissolvidos em 1 L de água destilada.

IV.5.4 Confirmação da presença e do tamanho do inserto ESAT-6 no plasmídeo Zero Blunt® TOPO®

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor Zero Blunt® TOPO®, o inserto do DNA plasmidiano foi amplificado por PCR utilizando-se os mesmos iniciadores descritos na tabela 4 e também digeridos com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RI.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µL contendo: 2,5 µL 10X PCR Buffer (Invitrogen); 0,75 µL de dNTP 10mM (Invitrogen); 0,3 µL de MgSO₄ 50 mM (Invitrogen); 0,5 µL do primer forward e 0,5 µL do primer reverse, ambos a 100 pMoles/µL; 0,5 µL da miniprep (100 ng/µL); 0,5 µL da enzima Taq DNA Polymerase Recombinant (5 u/µL) (Invitrogen); 19,65 µL de água milli-Q estéril. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 3 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos; anelamento dos primers a 65°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto e 30 segundos e extensão final por 10 minutos a 72°C. A reação ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). Após a reação, 1 µL do produto amplificado foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.3.

A reação de digestão foi realizada em um volume de 20 µL, que consistiu em 10 µL de DNA da miniprep (100 ng/µL), 2 µL de tampão REact3 (Invitrogen), 1 µL da enzima *Bam*HI (Invitrogen), 1 µL da enzima *Eco*RI (Invitrogen) e 6 µL de água Milli-Q estéril. A reação foi mantida a 37°C por 18 horas. Logo após, 10 µL da reação de digestão foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.3.

IV.5.5 Reação de sequenciamento e análises em sílico

A seqüência nucleotídica do inserto ESAT-6 clonada no vetor Zero Blunt® TOPO® foi confirmada através de sequenciamento utilizando-se os primers M13 forward 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' e M13 reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Figura 5) (Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit, Invitrogen). Para isto, foram escolhidos dois clones de *E. coli* pTP:ESAT-6, sendo cada um dos clones sequenciado três vezes *Forward* e três vezes *Reverse*. Cada amostra foi amplificada utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), como segue: 0,5 µL de "Reaction Mix"; 1,5 µL de tampão de diluição 5X; 2 µL do primer M13 forward ou reverse (0,8 pMoles/µL); 1 µL de DNA (100 ng/µL); 5 µL de água Milli-Q estéril. A reação ocorreu em um termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto,

seguida por 44 ciclos de 96°C por 15 segundos, anelamento dos primers a 55°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Logo após, os produtos da reação foram então precipitados e lavados, com o objetivo de remover os nucleotídeos marcados não incorporados ao DNA amplificado. Para isto, a cada amostra foi adicionado: 1 µL de EDTA 125 mM; 1 µL de acetato de sódio 3 M; 25 µL de etanol 100%. A mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se então com a centrifugação 3.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se então 35 µL de etanol 70% em cada tubo e os mesmos foram centrifugados a 1.650 x g por 15 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado. A amostra, precipitada e seca, foi armazenada a -20°C até a sua aplicação no Seqüenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram comparadas utilizando-se o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), onde obteve-se um *contig* único de cada clone, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. O *contig* final foi então analisado utilizando-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a comparação entre seqüências de ácidos nucléicos utilizou-se o programa “BLASTn” e para a comparação entre a seqüência de aminoácidos correspondente, o “BLASTx”.

IV.6 Subclonagem da ORF ESAT-6 no plasmídeo pValac

IV.6.1 Extração do plasmídeo pValac:gfp

Uma alíquota de 2 mL de uma cultura de *E. coli* pValac:gfp foi transferida para tubos de microcentrífuga e procedeu-se com a extração de plasmídeos com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme as recomendações do fabricante ou pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989), conforme item IV.5.3. A presença e a qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese seguindo-se os mesmos parâmetros já descritos no item IV.3.

IV.6.2 Digestão enzimática do plasmídeo pValac:gfp

Para a subclonagem da ORF ESAT-6 no vetor de expressão pValac:gfp (Figura 6), os plasmídeos extraídos no item IV.6.1 foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI

e *EcoRI*. A primeira reação de digestão enzimática foi realizada apenas com a enzima *EcoRI* para a verificação da linearização do plasmídeo, consistindo em: 1,7 µg do plasmídeo pValac; 2 µL do tampão REact 3 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM); 1 µL de *EcoRI* (10 U/µL); o que totalizou um volume final de 20 µL e reação. A reação foi mantida a 37°C por 6 horas. Para verificar a qualidade da digestão, 1 µL da reação foi depositado e resolvido em gel de agarose a 1%, conforme item IV.3. Após a visualização, 1 µL da enzima *BamHI* (10 U/µL) foi adicionada a mesma reação para a então liberação da ORF *gfp*. A reação foi mantida a 37°C por mais 6 horas. Novamente, para verificar a qualidade da digestão, 2 µL da reação foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1%, conforme item IV.3.

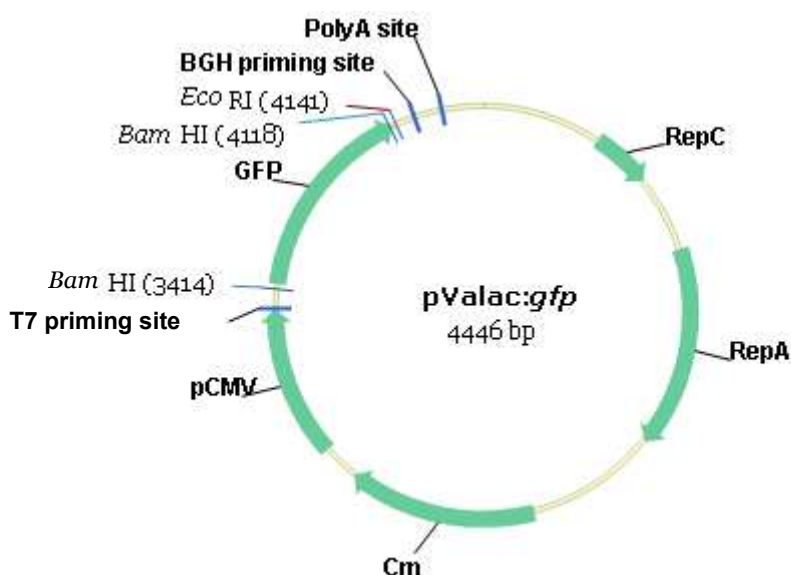


Figura 6: Representação esquemática do plasmídeo de expressão eucariótica pValac:gfp (Vaccination using Lactic acid bacteria) - pCMV: promotor do citomegalovírus; MCS: sítio de clonagem múltipla; BGH priming site e T7 priming site: primer para amplificação e/ou sequenciamento do inserto; polyA site: seqüência sinal de poliadenilação do Hormônio Bovino de Crescimento; RepA e RepC: origens de replicação procariótica; Cm: gene de resistência ao cloranfenicol; GFP: proteína Verde Fluorescente; *EcoRI* e *BamHI*: sítios de restrição utilizados.

IV.6.3 Purificação do fragmento de DNA do plasmídeo pValac digerido

O volume total da reação de digestão descrita no item V.6.2 foi depositada e resolvida em gel de agarose a 1%. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes ao vetor pValac (3.750 pb), desprovidos da seqüência codificadora da proteína verde fluorescente (*gfp*, 696 pb), foram purificados com o Kit illustra™ GFX™ PCR

DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram então estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e também em espectrofotômetro, assim como descrito no item IV.3.

IV.6.4 Digestão enzimática do plasmídeo pTP:ESAT-6 e purificação do fragmento de DNA ESAT-6

O plasmídeo pTP:ESAT-6 foi extraído a partir de um dos clones positivos de *E. coli* TOP10 (itens IV.5.2 e IV.5.3) e confirmado por sequenciamento (item IV.5.5). Em seguida, foi realizada uma reação de digestão enzimática que consistiu em: 30 µL de plasmídeos pTP:ESAT-6 (3 µg); 4 µL de tampão REact 3 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; MgCl₂ 10 mM; NaCl 100 mM); 1 µL de *Bam*HI (10 U/µL); 1 µL de *Eco*RI (10 U/µL); 4 µL de água milli-Q estéril, totalizando-se um volume final de 40 µL. A reação foi mantida por 37°C por 6 horas. O volume total da reação de digestão foi então depositado e resolvido em gel de agarose a 1%. Ao término da eletroforese, os fragmentos de DNA correspondentes a ORF ESAT-6 (aproximadamente 300 pb), provida das extremidades coesivas *Bam*HI e *Eco*RI, foram purificados com o Kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram então estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e também em espectrofotômetro, assim como descrito no item IV.3.

IV.6.5 Ligação da ORF ESAT-6 no vetor pValac

Os produtos digeridos e purificados correspondentes ao inserto ESAT-6 (item IV.6.4) e ao vetor pValac (item IV.6.3) foram submetidos a uma reação de ligação que conteve: 1,9 µL de ESAT-6 purificado (7,5 ng/µL); 6,2 µL de pValac purificado (10 ng/µL), o que resultou em uma proporção equimolar (3:1) de inserto/vetor; 1 µL de Ligase Buffer 10X (Promega); 1µL da enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi mantida à temperatura de 4°C durante 18 horas. Após este período, a ligação foi dialisada utilizando-se membrana Millipore (filtro de 0,025 µm), durante 30 minutos em água destilada.

IV.6.6 Transformação de *Escherichia coli* TG1 com o plasmídeo pValac:ESAT-6

O produto de ligação entre o vetor pValac e o inserto ESAT-6 foi utilizado para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1 preparadas de acordo com o protocolo descrito no item IV.5.1.

A transformação foi conduzida por eletroporação seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item IV.5.1. Para tanto, uma alíquota (10 µL) do produto de ligação, dialisada foi misturada a 100 µL de células eletrocompetentes e incubada no gelo por 20 minutos. A eletroporação se deu no aparelho GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD). Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.

O processo de seleção dos transformantes consistiu em semear alíquotas de 50 µL, 100 µL e o restante, cerca de 850 µL centrifugados, da suspensão de células eletroporadas em placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com 10 µg/mL de Clorafenicol (Cm). As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes ao Cm. A etapa seguinte consistiu na seleção de clones de cada uma das placas para proceder com a estocagem dos mesmos, a extração plasmidiana e confirmação da presença do inserto ESAT-6 no vetor pValac.

IV.6.7 Confirmação da presença e tamanho do inserto ESAT-6 no vetor pValac

Cada colônia selecionada foi inoculada em 5 mL de meio LB contendo Cm 10 µg/mL e mantidos a 37°C sob agitação por cerca de 18 horas. Uma alíquota (1 mL) de cada cultura foi estocada em freezer a -80°C, utilizando-se glicerol 80% na proporção de 1:1. O restante da cultura foi transferida para microtubos e procedeu-se com a extração plasmidiana pelo método de lise alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) com modificações conforme item IV.5.3.

Para verificar a presença do inserto e o peso molecular do fragmento de DNA clonado no vetor pValac, o inserto do DNA plasmidiano foi amplificado por PCR utilizando os mesmos iniciadores descritos na tabela 4 e digeridos com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Eco*RI.

As reações de PCR foram realizadas com a enzima AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) em um volume de 25 µL contendo: 2,5 µL 10X Accuprime™ PCR Buffer I (Tris-HCl 200 mM pH 8.4; KCl 50 mM; MgCl₂ 15 mM; dGTP 2 mM; dATP 2 mM; dTTP 2 mM; dCTP 2 mM; proteína termoestável Accuprime™; glicerol 10%); 0,5 µL do primer forward e 0,5 µL do primer reverse, ambos a 100 pMoles/µL; 0,5 µL de DNA da

miniprep (100 ng/ μ L); 0,5 μ L da enzima Accuprime™ Taq DNA Polymerase 5 u/ μ L; 20,5 μ L de água milli-Q estéril. A amplificação por PCR foi realizada sob as seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos; anelamento dos primers a 65°C por 30 segundos; extensão a 68°C durante 1 minuto e 30 segundos, extensão final por 10 minutos a 68°C. A reação ocorreu em um aparelho termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.). Após a reação, 2 μ L da mesma foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.3.

A reação de digestão foi realizada em um volume de 15 μ L, que consistiu em: 11,5 μ L do DNA (miniprep a 100 ng/ μ L); 1,5 μ L de tampão REact3 (Invitrogen); 1 μ L da enzima *Bam*HI (Invitrogen); 1 μ L da enzima *Eco*RI (Invitrogen). Após a reação, 10 μ L da mesma foram depositados e resolvidos em gel de agarose a 1% sob as mesmas condições descritas no item IV.3.

IV.6.8 Reação de sequenciamento e análises em sílico

A seqüência nucleotídica do inserto ESAT-6 clonada no vetor pValac foi confirmada através de sequenciamento utilizando-se os primers forward e reverse para a ORF ESAT-6 (Tabela 4). Para isto, um dos clones confirmados conforme o item IV.6.7 foi utilizado para a reação de sequenciamento, sendo realizadas duas repetições deste com o primer forward e duas com o primer reverse. Cada amostra foi amplificada utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) conforme o item IV.5.5. Após finalizada a PCR, os produtos de extensão foram então precipitados e lavados, com o objetivo de remover os nucleotídios marcados não incorporados ao DNA amplificado, conforme o item IV.5.5. A amostra foi armazenada a -20°C até a aplicação da amostra no Seqüenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

As seqüências foram comparadas utilizando-se o programa CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), onde obteve-se um *contig* único da seqüência de cada clone, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. O *contig* final foi então analisado utilizando-se o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponível no NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para a comparação entre seqüências de ácidos nucléicos utilizou-se o programa “BLASTn” e para a comparação entre a seqüência de aminoácidos correspondente utilizou-se o programa o “BLASTx”

IV.7 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 em cultura de células mamíferas

IV.7.1 Cultura de Células CHO (Chinese hamster ovary)

Células da linhagem Flp-InTM-CHO Zeocina resistentes (Invitrogen), armazenadas a -196°C (nitrogênio líquido) em criotubos e contendo meio completo com 10% de DMSO, foram descongeladas à temperatura ambiente e rapidamente colocadas em tubo falcon com 3 mL do meio de cultura para centrifugação (5 minutos, 800 rpm). Às células foram acrescentados 5 mL de meio completo em garrafas de 25 cm², mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C (Thermo Electron Corporation) até formação de uma monocamada.

As células Flp-InTM-CHO (Invitrogen) foram crescidas em garrafas de 75 cm² em meio Nutriente Mixture F12 Ham (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma), zeocina (100 ng/mL) e 2,5% de Hepes (Sigma) ou bicarbonato de sódio (NaHCO₃ - Sigma), para a manutenção do pH. As células foram incubadas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Todas as manipulações foram realizadas em capela exclusiva para cultivo celular, e as células visualizadas em microscópio invertido (Nikon Diaphot). Após formação da monocamada de células, o meio foi retirado e as células foram repicadas utilizando-se 2 mL de Tripsina (Sigma) por 3 minutos a 37°C e lavadas com PBS (Phosphate buffered saline). O excesso de células foi descartado ou utilizado para formação de nova placa. No dia posterior à tripsinização, o meio de cultura foi trocado para eliminação de células mortas e/ou não aderidas.

Soluções:

Meio Nutriente Mixture F12 Ham (Sigma): o meio foi preparado conforme recomendações do fabricante, sendo o pH ajustado para 7, esterelizado a vácuo utilizando-se filtro estéril de 0,22 µm e armazenado a 4°C, no escuro. O meio completo foi preparado adicionando-se ao F12 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de L-glutamina (Sigma), 2,5% de Hepes (Sigma) e 100 ng/mL de zeocina; todos filtrados anteriormente ou estéreis. Após o preparo, o meio F12 completo passou por um teste de esterelidade, onde 200 µL do meio foram colocados em meios de cultura para bactérias (BHI e TSB), fungos e leveduras (Sabouraud) e mantidos a 37°C ou temperatura ambiente, respectivamente. Além disto, 3 mL do meio completo também foram colocados em vidro estéril em estufa a 37°C. Durante 14 dias, o crescimento de bactérias e fungos foi acompanhado, sendo que com 5 dias sem contaminação o meio pôde ser utilizado.

L-glutamina (Sigma): 14,6124 g de L-glutamina em um volume final de água milli-Q de 500 mL. A solução foi então esterelizada utilizando-se filtro de 0,22 µm e estocada a -20°C.

Hepes (Sigma) 1 M: 23,9 g de Hepes dissolvido em 80 mL de água milli-Q, ajustou-se o pH para 7,2 e completou-se o volume para 100 mL. A solução foi então esterelizada utilizando-se filtro de 0,22 µm.

PBS 0,15 M (1X): 80,03 g de NaCl (sigma), 2,0121 g de KH₂PO₄ (Sigma), 2,0165 g de KCl (Merck), 9,1163 g de Na₂HPO₄ (Crq) e água milli-Q q.s.p 10 L. A mistura foi esterelizada por autoclavação a 121°C 15 minutos.

IV.7.2 Transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac:ESAT-6

IV.7.2.1 Obtenção do DNA para Transfecção

Os DNAs plasmídianos (pValac:ESAT-6 e pValac:gfp) utilizados para transfecção das células CHO foram obtidos a partir da linhagem *E. coli* pvalac:ESAT-6 e *E. coli* pValac:gfp (controle positivo da transfecção), utilizando-se o Kit Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante. Após a extração plasmídiana, o DNA foi quantificado utilizando-se o aparelho GeneQuant (Pharmacia Biotech). No momento da transfecção, os respectivos DNAs foram esterelizados utilizando-se filtro de 0,22 µm.

IV.7.2.2 Padronização da transfecção de células CHO com o plasmídeo pValac:gfp

As células CHO, crescidas até formação da monocamada, foram tripsinizadas e, então, colocadas em tubo falcon e centrifugadas. O precipitado celular foi diluído em 2 mL de meio F12 completo para contagem das células em câmara de Neubauer ou no aparelho “Contador de Células e Partículas Beckman Coulter Z1”, conforme recomendações do fabricante. Placas de 6 poços foram utilizadas para transfecção, sendo que a cada poço foram adicionadas 300.000 células e 2 mL de meio completo. As células foram mantidas dois dias crescendo a 37°C em estufa de CO₂ para obtenção da confluência de 90-95% necessária para a transfecção.

O reagente Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) foi utilizado para transfecção celular, conforme recomendações do fabricante. Para a padronização da transfecção, o meio de cultura antigo foi retirado e 2 mL de meio novo foram adicionados a cada poço no momento da transfecção sendo que, para cada poço, foram utilizados 4 µg de DNA (pValac:gfp)

diluídos em 250 µL de Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Invitrogen) e Lipofectamine™ 2000 nas proporções “DNA(µg):Lipofectamine(µL)” de: 1:2, 1:2,5 e 1:3 (8 µL, 10 µL e 12 µL de lipofectamine). As diferentes proporções do reagente também foram diluídas em 250 µL de Opti-MEM® e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, o DNA e o Lipofectamine diluídos separadamente foram misturados para vesicularização do DNA nos lipossomos, sendo mantidos 20 minutos em repouso à temperatura ambiente. Cada poço recebeu a mistura DNA:Lipofectamine, sendo incubadas a 37°C por 24, 48 e 72 horas para verificação da expressão do transgene GFP. Como o meio de cultura pode ser trocado após 4 horas da transfecção, duas condições foram então testadas: manutenção do meio de cultura inicial (F12) ou sua troca por F12 completo contendo 1% de uma suspensão de Antibiótico e Antimicótico estabilizada (Sigma).

Assim, após a transfecção celular com o plasmídeo pValac:*gfp*, a fluorescência da proteína GFP pôde ser visualizada em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200, utilizando-se o filtro azul (objetiva de 20X), e a imagem capturada em câmera AxioCam HRc (ZEISS) utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

A partir da padronização da transfecção celular com o plasmídeo pValac:*gfp*, todos os experimentos de transfecção que se seguem foram realizados nas melhores condições obtidas, utilizando-se agora o plasmídeo pValac:*ESAT-6*. Em todas as transfecções seguintes, sempre foi feito por placa um controle positivo com o pValac:*gfp*, para visualização da eficiência da transfecção do experimento em geral em microscopia de fluorescência; para assim seguir com as extrações protéicas, de RNA e marcação imunocitoquímica das células transfectadas com o plasmídeo pValac:*ESAT-6*.

IV.7.3 Verificação da expressão de ESAT-6 em células mamíferas por RT-PCR

IV.7.3.1 Extração do RNA total das células transfectadas

Após 48 horas da transfecção com o plasmídeo pValac:*ESAT-6*, células CHO transfectadas (controle positivo) e não transfectadas (controle negativo) foram removidas mecanicamente de cada poço, utilizando-se espátulas estéreis (*scraper*), lavadas uma vez em PBS livre de RNase. A partir do precipitado celular, foi extraído o RNA total com o kit illustra RNAspin Mini Isolation (GE Life Sciences) ou com o kit Total RNA Isolation - NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel), conforme as recomendações dos fabricantes.

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de RNA foram realizados utilizando-se materiais dedicados exclusivamente a esta finalidade. Todo material utilizado para extração e manipulação do RNA foi tratado ou adquirido livre de RNases, como

ponteiras plásticas contendo filtro e microtubos, todos “RNase-Free”. O DEPC (Diethyl pirocarbonato – Invitrogen), na concentração de 0,01%, foi utilizado para o tratamento de todas as águas milli-Q, sendo posteriormente inativado por 15 min, por autoclavação. A superfície das bancadas, dos equipamentos e as micropipetas utilizadas foram higienizados e tratados com o *spray* “RNase Exterminator” (BioAgency), conforme a recomendação do fabricante. Se necessária a estocagem dos pelles celulares, a estabilização do RNA celular foi realizada com 100 µL de “RNAlater® Tissue Collection: RNA Stabilization Solution” (Applied Biosystems), sendo o pellet ressuspensionado nesta solução e mantido a -20°C.

O RNA também foi extraído pelo método de Trizol (Invitrogen). Foram utilizados para a extração 3 poços contendo células transfectadas com o pValac:ESAT-6 e 3 poços contendo células não transfectadas (controle negativo), sendo o meio de cultura retirado da placa e esta lavada 2X com 1 mL de PBS 0,15 M. Assim, foi adicionado a cada poço 333 µL de Trizol e incubado temperatura ambiente por 5 minutos. As células provenientes dos três poços foram colocadas em apenas um microtubo, onde 200 µL de clorofórmio foi adicionado, vortexado durante 20 segundos e incubado temperatura ambiente por 2 minutos. A mistura foi então centrifugada a 4°C por 15 minutos a 12.000 rpm e a fase aquosa recuperada em novo tubo. Para a precipitação do RNA, 500 µL de álcool isopropílico foi acrescentado e a mistura incubada por 4 horas a -20°C e mais 30 minutos a -70°C, sendo, em seguida, centrifugada a 4°C por 20 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado, foi adicionado 1 mL de etanol 75% gelado e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 7.500 rpm, sendo o sobrenadante descartado novamente e o precipitado seco em Thermomixer até ficar transparente. Foram ainda adicionados ao mesmo 30 µL de água tratada com DEPC e livre de RNases para eluição do RNA. Todo o RNA foi quantificado a 260 e 280 nm no aparelho GeneQuant (Pharmacia Biotech) e também resolvido em gel de agarose a 1% para verificação de sua integridade, através da visualização dos RNAs 28S e 18S.

IV.7.3.2 RT-PCR para a verificação da expressão de ESAT-6 em células CHO

Foram realizados experimentos de RT-PCR (Transcriptase Reverse PCR), ou seja, a amplificação por PCR de um produto de Transcrição Reversa (cDNA. Para isto, o cDNA foi sintetizado utilizando RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), utilizando-se o RNA total de células transfectadas ou não com o plasmídeo pValac:ESAT-6. Para isto, em cada reação foi utilizado 1 µg do RNA total extraído, 1 µL do primer Oligo (dT)₁₈ e o volume completado com água DEPC para 12 µL, sendo esta reação mantida 5 minutos a 65°C em Banho Maria. Logo após, foram adicionados 4 µL do Reaction Buffer 5X,

1 µL de RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µL), 2 µL de dNTP Mix (10 mM) e 1 µL de RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µL), sendo esta reação (20 µL) mantida 60 minutos a 42°C para síntese do cDNA e 5 minutos a 70°C para término da reação. O cDNA sintetizado foi logo utilizado para a PCR específica.

Como controles negativos da RT-PCR foram utilizados RNAs totais das células transfectadas com o pValac:ESAT-6 e de células não transfectadas em uma reação de RT-PCR sem a enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase, para verificação da presença de algum DNA genômico ou plasmidiano na amostra. Como controle positivo da RT-PCR, utilizou-se 100 ng de RNA específico do gene GAPDH (Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase), em uma reação contendo 1 µL do primer Oligo (dT)₁₈, conforme descrito anteriormente.

A partir dos cDNAs obtidos, seguiu-se com uma reação de PCR utilizando-se os primers específicos para a ORF ESAT-6 (Tabela 4) nas amostras de cDNA de células transfectadas com pValac:ESAT-6 e células não transfectadas (controle negativo). Foi utilizado em cada reação 0,25 µL de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), 2,5 µL de 5X GoTaq® Green Reaction Buffer (Promega) contendo MgCl₂ (7.5 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 17,75 µL de água milli-Q estéril, 1µL do primer forward (100 pMoles/µL), 1µL do primer reverse (100 pMoles/µL) e 2 µL do cDNA obtido a partir de 1µg de RNA total. Para a amostra de cDNA do controle positivo, 1,5 µL dos primers forward e reverse específicos para GAPDH (10 µM) e 2 µL do cDNA diluído 1:1.000 foram utilizados. A PCR foi realizada em aparelho GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) com o seguinte programa: desnaturação inicial 94°C 3 minutos, 35 ciclos de 94° 30 segundos, anelamento gradiente 58-62°C 30 segundos, extensão 72°C 45 segundos e extensão final 3 minutos. Logo após, o produto amplificado foi depositado, resolvido e analisado em gel de agarose a 1%.

IV.7.4 Verificação da produção de ESAT-6 por Western Blotting

IV.7.4.1 Extração de proteínas das células transfectadas

Após 64 horas de transfecção seguiu-se à extração protéica tanto das células transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 quanto das células não transfectadas (controle negativo). O precipitado celular de 3 poços foi lavado com PBS, ressuspenso em 50 µL de Tampão de Lise Celular contendo o Coquetel Inibidor de Protease (Roche), vortexado e incubado 37°C por 10 minutos. Logo após, este foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e estocado a -20°C.

Solução:

Tampão de Lise Celular: 50 mM de Tris pH 7.8; 150 mM de NaCl e 1% de Nonidet P-40 (Roche). No momento da extração, em 250 µL da solução de lise, adicionou-se um volume de 35,7 µL de uma solução concentrada 7X de “Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets” (Roche).

IV.7.4.2 Resolução eletroforética das proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante

As proteínas extraídas tanto das células transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 quanto das células não transfectadas (controle negativo), foram resolvidas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE – “Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”). Para isto foi utilizado gel de “separação” na concentração de 15% e o gel de “concentração” a 4%. A eletroforese foi conduzida com voltagem constante de 180 V, 120 mA e 70 W em tampão de corrida Tris-glicina.

Aos geis foram aplicados 3 µL do padrão Page Ruler Protein Ladder (Fermentas) e 20 µL das proteínas em Tampão de amostra

Soluções:

Acrilamida/Bisacrilamida: 29,2 g de acrilamida, 0,8 g de bisacrilamida e água milli-Q q.s.p. 100 mL.

Gel de Poliacrilamida 15% (separação): 5 mL de acrilamida/bisacrilamida; 2,5 mL de Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 100 µL de SDS 10%; 2,34 mL de água milli-Q; 70 µL de PSA 10% e 14 µL de TEMED.

Gel de Poliacrilamida 4% (concentração): 650 µL de acrilamida/bisacrilamida, 1,25 mL de Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 50 µL de SDS 10%, 3,05 mL de água milli-Q, 35 µL de PSA 10% e 7 µL de TEMED.

Tampão de corrida Tris-glicina (10X): 30 g de Tris-base, 144 g de Glicina, 10 g de SDS e água milli-Q q.s.p. 1 L (concentração de uso: 25 mM tris; 250 mM glicina; 0,1% SDS).

Tampão da Amostra: 1 mL Tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 800 µL de glicerol, 1,6 mL de SDS 10%, 200 µL de azul de bromofenol 2% e 4,6 mL de água milli-Q.

IV.7.4.3 Visualização dos extratos protéicos pelo método de Nitrato de Prata

Para a simples visualização das proteínas provenientes tanto das células transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 quanto das células não transfectadas (controle negativo), os respectivos extratos foram resolvidos em SDS-PAGE e, em seguida, o mesmo foi submetido à coloração pelo método de nitrato de prata. A coloração iniciou-se com a imersão do gel na Solução Fixadora, por 5 minutos, seguido de uma lavagem com água destilada, por outros 5 minutos. Seguiu-se então com a imersão do mesmo agora em Solução Oxidante, por 5 minutos, e enxágüe com água destilada, por aproximadamente 10 minutos, até que a coloração “amarelada” fosse diminuída. Em seguida, o gel ficou submerso na solução de Prata por 20 minutos, no escuro. Em seguida, o gel foi rapidamente exaguado com água destilada e submetido à Solução Reveladora.

Soluções:

Solução Fixadora: 45 mL de Etanol, 90 mL de Ácido acético e 865 mL de água destilada.

Solução Oxidante: 100 mg de Dicromato de Potássio, 28 µL de ácido Nítrico, água destilada q.s.p. 100 mL.

Solução de Prata: 200 mg de Nitrato de Prata, água destilada q.s.p. 100 mL.

Solução Reveladora: 3 g de Carbonato de Sódio, 50 µL de Formaldeído, água destilada q.s.p. 100 mL.

IV.7.4.4 Western Blotting

Para a detecção do antígeno ESAT-6 proveniente das células transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6, os respectivos extratos protéicos foram resolvidos em SDS-PAGE, o qual, em seguida, foi submetido ao método de Western Blotting. Para tanto, o gel foi colocado em Tampão de Transferência juntamente com a membrana de nitrocelulose, previamente embebida em metanol, papel filtro e espuma em cassete próprio. A transferência foi realizada no sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad), nas seguintes condições: tensão de 110 V e corrente de 400 mA. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi armazenada em PBS 0,15 M e 0,1% de Tween-20 a 4°C, até o momento do uso. A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose pôde ser visualizada com o corante Ponceau 0,1% em ácido acético a 1%.

A imunodeteção de ESAT-6 foi realizada utilizando-se o anticorpo primário policlonal anti-ESAT-6 (*Rabbit polyclonal to ESAT6* – abcam) na concentração final de 0,5 µg/mL e o Kit “WesternBreeze® Chromogenic Immunodetection” - *Anti rabbit* (Invitrogen) conforme recomendações do fabricante.

Soluções:

Tampão de Transferência (pH 8,3): 3,03 g de Tris (25 mM), 14,4 g de glicina (192 mM), 200 mL de metanol (20%) e água destilada q.s.p. 1 L.

PBS 0,15 M: 137 mM de NaCl (8 g), 2,7 mM de KCl (0,2 g), 10 mM de Na₂HPO₄ (1,44 g), 1,8 mM de KH₂PO₄ (0,24 g), água destilada q.s.p. 1L; pH 7,4. A solução foi esterelizada por autoclavação.

PBS 0,15M e 0,1% de Tween-20: 500 µL de Tween-20 em 500 mL de PBS 0,15 M.

Corante Ponceau 0,1% em ácido acético a 1%: 0,5 g de Ponceau em 400 mL de água, 5 mL de ácido acético glacial e água destilada q.s.p. 500 mL.

IV.7.5 Verificação da produção de ESAT-6 por Imunocitoquímica

IV.7.5.1 Visualização da proteína ESAT-6 através da marcação com Fitc

A transfecção das células CHO para imunocitoquímica ocorreu conforme item V.7.2, porém antes da montagem da placa, foi depositada, no fundo de cada poço, uma lamínula para que houvesse o crescimento celular na superfície da mesma. Após 48 horas da transfecção com o pValac:ESAT-6, seguiu-se a confecção de lâminas para detecção da proteína ESAT-6 por imunofluorescência. Lâminas de células não transfectadas (controle negativo das células), de células transfectadas e tratadas somente com anticorpo secundário (controle negativo do anticorpo secundário) e células transfectadas com o plasmídeo pValac:gf_p (controle positivo), também foram confeccionadas.

O meio de cultivo celular foi retirado dos poços e este lavado 2X com 1 mL de PBS. Em seguida, as células foram fixadas em 700 µL paraformaldeído a 4%, durante 15 minutos sem agitação, e lavadas novamente 2X com 1 mL de PBS. As células foram então permeabilizadas com 700 µL de Triton X-100 0,1% em PBS por 10 minutos para incubação com o anticorpo primário policlonal anti-ESAT-6 (*Rabbit polyclonal to ESAT6* – abcam) na concentração inicial de 0,5 mg/mL, diluído 1:50 em PBS/BSA 1% (PBS: “Phosphate Buffered

Saline”; BSA: “Bovine Serum Albumin”). Para cada lamínula, 100 µL do anticorpo primário diluído foram depositados sobre um papel filme onde a lamínula foi invertida para incubação em câmara úmida por duas horas à temperatura ambiente. As lamínulas foram colocadas novamente na placa, lavadas 3X com 1 mL de PBS, agitando-se levemente. A lamínula foi então incubada (câmara úmida no papel filme) em 100 µL do anticorpo secundário IgG Anti Rabbit contendo o fluorocromo Fitc (Sigma), na diluição 1:1.000 em PBS/BSA 1% por uma hora 37°C. Após 4 lavagens, com 1 mL de PBS, a lâmina foi acrescida de 15 µL de glicerina tamponada e vedada com esmalte transparente.

As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200 (objetiva de 20X) utilizando-se o filtro para Fitc (azul), e as imagens capturadas em câmera AxioCam HRc (ZEISS) utilizando-se o programa AxioVision 4.8.1.

Soluções:

Paraformaldeído a 4%: 10 mL de PBS 1X, 0,4 g de paraformaldeído e 25 µL de NaOH 5 M.

NaOH 5 M: 10 g de NaOH e água destilada q.s.p. 50 mL.

PBS e 0,1% Triton X-100: 100 µL de Triton X-100 (Sigma) e PBS 0,15 M q.s.p. 100 mL.

PBS/BSA 1%: 1 g de BSA (USBiological) em 100 mL de PBS 0,15 M.

Tampão Bicarbonato 0,5 M pH 8,0 - 8,5: 4,2 g de NaHCO₃, água destilada q.s.p. 100 mL; pH 8,0 - 8,5.

Glicerina Tamponada pH 9,0: 9 mL de glicerina e 1 mL de Tampão Bicarbonato; pH 9,0.

IV.7.5.2 Visualização da proteína ESAT-6 através da marcação com Alexa 488

A transfecção das células CHO para imunocitoquímica ocorreu conforme item IV.7.2, porém antes da montagem da placa, foi depositada, no fundo de cada poço, uma lamínula para que houvesse o crescimento celular na superfície da mesma. Após 64 horas da transfecção com o pValac:ESAT-6, seguiu-se a confecção de lâminas para detecção da proteína ESAT-6 por imunofluorescência conforme item IV.7.5.1, utilizando-se o anticorpo primário policlonal anti-ESAT-6 (*Rabbit polyclonal to ESAT6* – abcam) na concentração inicial de 0,5 mg/mL diluído 1:50 e o anticorpo secundário IgG anti-coelho Alexa-Fluor 488

(Invitrogen) na concentração inicial de 2 mg/mL diluído 1:500. Lâminas de células transfectadas foram tratadas com o anticorpo primário e secundário (positivo) ou somente com anticorpo secundário (controle negativo do anticorpo secundário), sendo que para marcação nuclear as lâminas também foram incubadas com DAPI (4,6'-diamidino-2-phenylindole - Invitrogen) na concentração final de 2 µg/mL.

As lâminas foram visualizadas em Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss, utilizando-se a objetiva de 63X com óleo de imersão. Para detecção da fluorescência da Alexa flúor 488, foi utilizado o laser de argônio e o filtro azul com emissão máxima a 520 nm. Para detecção do DAPI foi utilizado a epifluorescência do mesmo microscópio, utilizando-se o filtro para DAPI com emissão na faixa de 461 nm. A colocação das imagens com dupla marcação foi realizada pela sobreposição das imagens digitais separadas de cada fluorocromo, imagens estas visualizadas e editadas no programa Zeiss LSM Image Browser.

IV.8 Transformação de *L. lactis* FnBPA com pValac:ESAT-6

IV.8.1 Confeção de células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA

A preparação de células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA foi realizada como segue. Um primeiro inóculo foi realizado com 10 µL do estoque de *L. lactis* FnBPA em 5 mL do meio M17 suplementado com Sacarose (0,5 M) e Glicose (0,5%) (M17-Sac-Gli) acrescido ainda de 5 µg/mL do antibiótico eritromicina (Ery) (Sigma). Este inóculo foi mantido a 30°C, sem agitação, até a manhã seguinte, totalizando-se 20 horas de crescimento. Um segundo inóculo foi realizado com 100 µL dessa primeira cultura, que foi novamente inoculada em 5 mL do meio M17-Sac-Gli acrescido de 5 µg/mL de eritromicina, o qual foi incubado a 30°C, sem agitação, por 8 horas. Uma alíquota de 1 µL desta última cultura foi então inoculada em 200 mL de meio M17-Sac-Gli acrescido de 1% de glicina. Uma vez que a cultura alcançou uma DO_{600nm} em torno de 0,4 - 0,6, esta foi centrifugada a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi então ressuspensão em 200 mL de uma solução gelada e estéril constituída de sacarose 0,5 M e glicerol 10%. Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais quatro vezes e, após a última lavagem, o precipitado celular foi ressuspensão em 1 mL de uma solução estéril constituída de PEG3000 30% (Polyethylene glycol 3000) e glicerol 10%. Alíquotas de 100 µL dessas células foram estocadas a -70°C até o momento do uso.

Meios e Soluções:

M17-Sac-Gli (M17 sacarose glicose): 21 g meio de cultivo M17 (Fluka analytical®) foram dissolvidas em água destilada até completar-se 250 mL, sendo que o meio ficou concentrado 2X. A solução de sacarose (PM: 342,3) foi preparada dissolvendo-se 85,5 g desta em água destilada até completar 250 mL, resultando em uma solução 1 M. O meio M17 e a solução de sacarose foram esterelizados, separadamente, a 121°C por 15 minutos e a glicose 50% foi filtrada. Em capela de fluxo laminar, o M17, a sacarose e 5 mL de glicose 50% foram misturados, resultando em M17 1X, Sacarose 0,5 M, Glicose 0,5%.

Glicina: a solução estoque 20% de glicina foi preparada diluindo-se 10 g desta em água destilada q.s.p. 50 mL e esterelizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

Sacarose 0.5 M e glicerol 10%: 105 mL de glicerina e 179,5 g de sacarose foram diluídos em água destilada q.s.p. 1,05 L. A mistura foi esterelizada por autoclavação a 121°C por 15 minutos.

PEG3000 30% e glicerol 10%: 3 g de PEG3000, 1 mL de glicerol e água destilada q.s.p. 10 mL.

IV.8.2 Transformação de *L. lactis* FnBPA com o plasmídeo pValac:ESAT-6

Os plasmídeos extraídos (pValac:ESAT-6) no item IV.6.7 foram utilizados para a transformação de *L. lactis* FnBPA. Uma alíquota de células eletrocompetentes preparadas no item IV.8.1 foram colocadas no gelo por 5 minutos e, logo após, 2 µL do plasmídeo pValac:ESAT-6 (150 ng/µL) foram adicionados às mesmas. O plasmídeo pValac:gfp também foi utilizado para transformação de *L. lactis* FnBPA, com a finalidade de utilização da linhagem resultante como um controle positivo em experimentos futuros. As células foram mantidas em contato com o DNA plasmidiano por 5 minutos no gelo e, logo após, foram colocadas em uma cubeta de 2 mm para a eletroporação no aparelho GenePulser XCell™ Electroporation System Quick Guide (Bio-RAD), nas seguintes condições: 2400 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, 1 mL de M17-Sac-Gli foi adicionado às células e a mistura foi então mantida a 30°C por 3 horas, sem agitação. Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.

A seleção dos transformantes ocorreu em placas M17-Sac-Gli ágar acrescidas de Cm (5 µg/mL) e Ery (2,5 µg/mL) para a seleção dos dois plasmídeos presentes na linhagem

invasiva: o recém transformado pValac:ESAT-6 ou pValac:gfp e o plasmídeo já existente na linhagem, pOri23-fnbA, respectivamente. As placas foram mantidas a 30°C por aproximadamente 24 horas. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias resistentes tanto à Cm quanto à Ery. Na etapa seguinte, três clones de cada uma das placas foram selecionados para extração plasmidiana e confirmação da presença das ORFs codificadoras de ESAT-6 ou GFP. Os clones selecionados foram cultivados, as culturas foram diluídas (1:4), em glicerol 80%, e acondicionadas em um ultrafreezer a -80°C.

IV.8.3 Extração do DNA plasmidiano de *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)

As colônias resultantes da transformação de *L. lactis* FnBPA com o plasmídeo pValac:ESAT-6 e pValac:gfp, foram inoculadas em 5 mL de M17-Sac-Gli suplementado com Ery (2,5 µg/mL) e Cm (5 µg/mL) e a cultura mantida a 30°C por aproximadamente 18 horas, sem agitação. Para a extração dos plasmídeos, foi utilizado o método de lise alcalina assim como descrito no item IV.5.3, com algumas modificações: após a primeira centrifugação, foram adicionados, ao precipitado celular, 250 µL de TE-Lisozima (TE-LYS). A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Após este período, seguiu-se normalmente o protocolo (item IV.5.3).

Solução:

TE-LYS: TE 0,5X (10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl) e 10 mg/mL Lisozima

IV.8.4 Confirmação dos clones *L. lactis* FnBPA portadores do plasmídeo pValac:ESAT-6

Com o objetivo de confirmar a obtenção de clones da linhagem de *L. lactis* FnBPA portadores do plasmídeo pValac:ESAT-6 ou pValac:gfp, os plasmídeos extraídos no item IV.8.3 foram submetidos a uma reação de PCR com uma combinação de iniciadores descritos na Tabela 5. Foi preparado um mix para a reação de PCR nas seguintes condições: 3 µL de dNTP, 12 µL de MgCl₂ (25 mM; Promega), 30 µL de 5X Colorless Flexi Reaction Buffer (Promega), 0,75 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) e 74,25 µL de água milli-Q estéril. As reações foram realizadas em volumes de 10 µL cada, com 8 µL do mix, 0,5 µL de cada primer (Forward e Reverse) e 1 µL de DNA (100ng). Nenhum DNA foi acrescentado ao controle negativo das reações. As reações ocorreram em um aparelho

termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) nas seguintes condições: primeira desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos primers gradiente 56-65°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 1 minuto, extensão final por 5 minutos a 72°C.

Tabela 5: Primers utilizados na reação de PCR da ORF ESAT-6, *gfp* e de parte da ORF FnBPA

Iniciador “forward”: ValF (amplificação de 84 pb anteriores a ORF clonada com <i>Bam</i> HI) Tm: 58.7°C	5' GCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG 3'
Iniciador “reverse”: ValR (amplificação de 72 pb após a ORF clonada com <i>Eco</i> RI) Tm: 59.5°C	5' GGCTGATCAGCGGGTTTAAACG 3'
Tamanho do fragmento amplificado (<i>gfp</i>)	860pb
Iniciador “forward” da FnBPA: FnAF (anelamento dentro da ORF FnBPA) Tm: 60°C	5' TCAGCTATTGATATCGATTA 3'
Iniciador “forward” da FnBPA: FnAR (anelamento dentro da ORF FnBPA) Tm: 52°C	5' CAACACTATTGTGTCCACCG 3'
Tamanho do fragmento amplificado (parte do gene da FnBPA)	807pb
Iniciador “forward” de ESAT-6 Tm:62°C	5' – GGATCCACCATGGAGCAGCAGTGGAAATTCGCG – 3'
Iniciador “reverse” de ESAT-6 Tm:62°C	5' – GAATTCCTATGCGAACATCCCAGTGACG - 3'
Tamanho do fragmento amplificado (ORF ESAT-6)	300 pb

V.RESULTADOS E DISCUSSÃO

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor pValac

O primeiro passo deste trabalho consistiu no isolamento, por PCR, da ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis* a partir do DNA total da linhagem H37Rv. Nos pares de iniciadores utilizados (Tabela 4), a presença de sítios artificiais de restrição (*Bam*HI e *Eco*RI) foram utilizados para que a ORF ESAT-6 pudesse ser clonada de forma direcionada e na fase de leitura correta no vetor pValac.

V.1.1 Amplificação da ORF ESAT-6

Para a reação de amplificação foi utilizada a enzima DNA polimerase Pfx Platinum[®] (Invitrogen), cuja atividade é altamente estável e de alta especificidade e precisão, sendo ideal para amplificações por PCR que requerem taxas mínimas de mutações (inserções, deleções, ou trocas) durante a incorporação de nucleotídeos.

Neste contexto, foi verificada a amplificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 300 pb, assim como esperado para a ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis*. Como controle negativo das reações foi utilizado água milli-Q estéril ao invés do DNA de *M. tuberculosis*. Os fragmentos amplificados, quando visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio, apresentaram forte intensidade, demonstrando uma alta eficiência da reação. Porém, também observou-se a presença de um produto de amplificação, provavelmente inespecífico e de maior peso molecular, que ESAT-6. Desta forma, seguiu-se a purificação do fragmento de 300 pb de interesse, ESAT-6. Como esperado, não foi observado qualquer produto de amplificação no controle negativo (Figura 7).

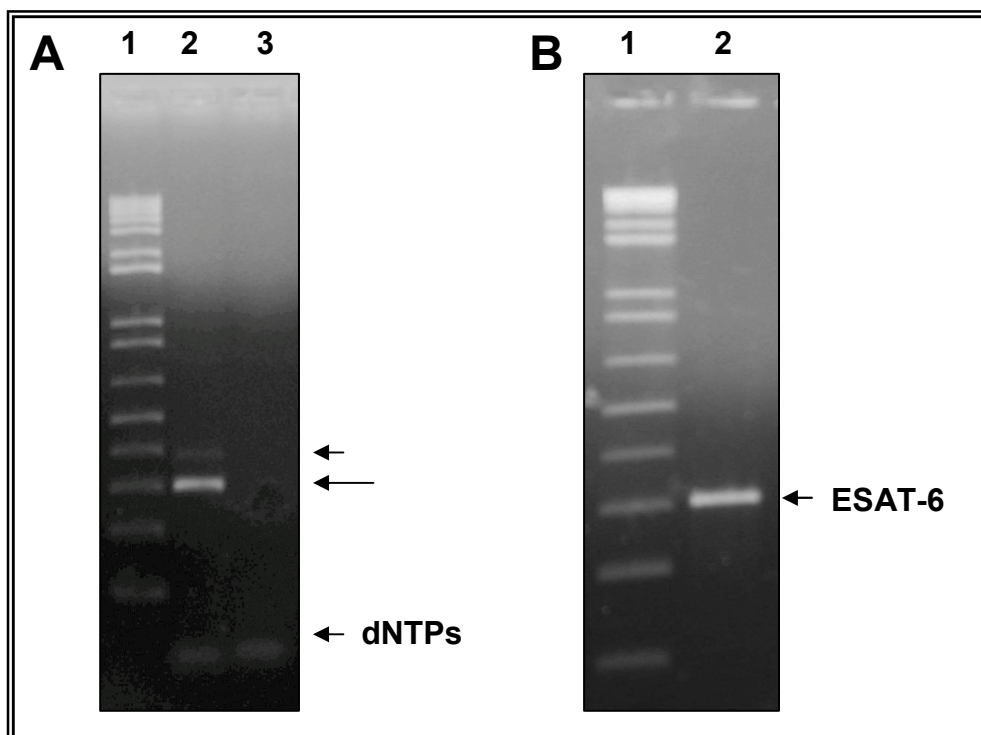


Figura 7: Análise do produto de amplificação por PCR da ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis* e Purificação. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Análise do produto de amplificação: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produtos da amplificação - ESAT-6 (seta maior) e a banda inespecífica (seta menor); Canaleta 3: Controle negativo da reação. B) Purificação do produto da PCR: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Purificação da ORF ESAT-6.

V.1.2 Clonagem da ORF ESAT-6 no sistema TOPO

O fragmento amplificado no item V.1.1, correspondente à seqüência codificadora do gene ESAT-6 de *M. tuberculosis*, foi clonado no vetor Zero Blunt® TOPO®, um vetor linear que apresenta a topoisomerase I do vírus *Vaccinia* ligada covalentemente à extremidade 3' fosfato de cada fita de DNA. A ligação entre a topoisomerase I e o DNA do vetor é capaz de fornecer energia à ligação do inserto, liberando então a enzima.

Desta forma obteve-se o plasmídeo pTP:ESAT-6. A geração deste “plasmídeo intermediário” foi necessária, haja vista que a digestão enzimática do mesmo levará a liberação do inserto, neste caso a ORF ESAT-6, com extremidades coesivas, as quais permitirão que o mesmo seja clonado de forma direcionada e em fase de leitura correta no vetor de expressão, o pValac.

Este plasmídeo foi então utilizado para transformar células de *E. coli* TOP10 eletrocompetentes. A seleção de colônias de *E. coli* recombinantes foi realizada em meio LB ágar contendo canamicina. Aproximadamente 18 horas após a transformação, foi possível a visualização de 67 colônias recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do

controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Dez colônias transformadas foram escolhidas de forma aleatória, inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas a 37°C por 18 horas. Essas culturas foram então individualmente estocadas em glicerol para uma posterior confirmação da presença do plasmídeo pTP:ESAT-6.

O DNA plasmidiano extraído foi então utilizado como molde para confirmar a clonagem do inserto através de uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para a ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis*. Oito dos dez clones foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à ORF ESAT-6 (300 pb). A figura 8 mostra um dos produtos de amplificação da ORF ESAT-6 obtidos a partir do DNA plasmidiano proveniente de um dos clones escolhidos aleatoriamente. O controle negativo da reação, no qual utilizou-se água milli-Q estéril ao invés de DNA molde, não demonstrou qualquer sinal de amplificação e o DNA genômico de *M. tuberculosis* foi utilizado como controle positivo da reação (Figura 8A). Além disto, o pTP:ESAT-6 foi submetido a uma reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI; o que resultou em dois fragmentos visíveis: um de aproximadamente 300 pb, correspondente à ORF ESAT-6 e outro de 3.470 pb, correspondente ao vetor Zero Blunt® TOPO® (Figura 8B). Sendo assim, ambos os dados confirmaram a obtenção do plasmídeo pTP:ESAT-6.

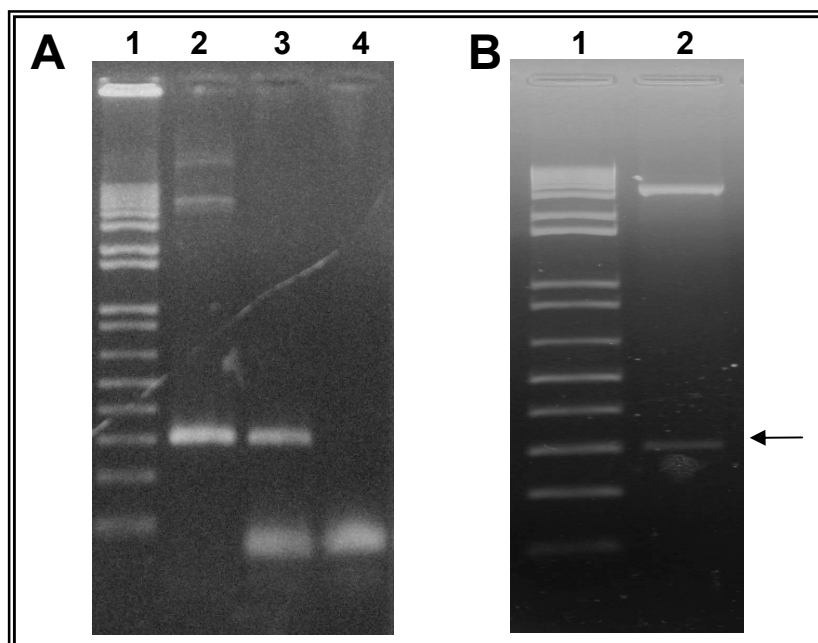


Figura 8: Amplificação por PCR da ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis* e digestão enzimática a partir do DNA plasmidiano extraído de células de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pTP:ESAT-6. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Amplificação da ORF ESAT-6. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Inseto ESAT-6 amplificado por PCR a partir do DNA plasmidiano extraído de um dos dez clones de *E. coli* TOP10; Canaleta 3: Controle positivo da PCR utilizando-se o DNA genômico de *M. tuberculosis*; Canaleta 4: Controle negativo da PCR. B) Digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da digestão enzimática, resultando nos fragmentos visíveis de 300 pb e 3.470 pb, correspondentes à ORF ESAT-6 e ao vetor Zero Blunt® TOPO®, respectivamente.

V.1.2.1 Confirmação da integridade da seqüência nucleotídica da ORF ESAT-6 clonada no vetor Zero Blunt TOPO através da técnica de sequenciamento e análises *in silico*

O plasmídeo pTP:ESAT-6 foi extraído dos clones de *E. coli* previamente confirmados por PCR e por digestão enzimática, e dois destes foram então submetidos a reações de sequenciamento de DNA utilizando-se os primers M13 (item IV.5.5). Assim, um *contig* único da seqüência de cada clone foi obtido com o programa CAP3 Sequence Assembly, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. A partir desta seqüência otimizada, foi possível confirmar a presença do inserto correspondente à seqüência codificadora do gene ESAT-6, através de alinhamento (BLASTn) utilizando-se o banco de dados do NCBI. Além disso, através do sequenciamento também foi possível verificar a integridade da seqüência de Kozak e dos sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI no inserto clonado (Figura 9).

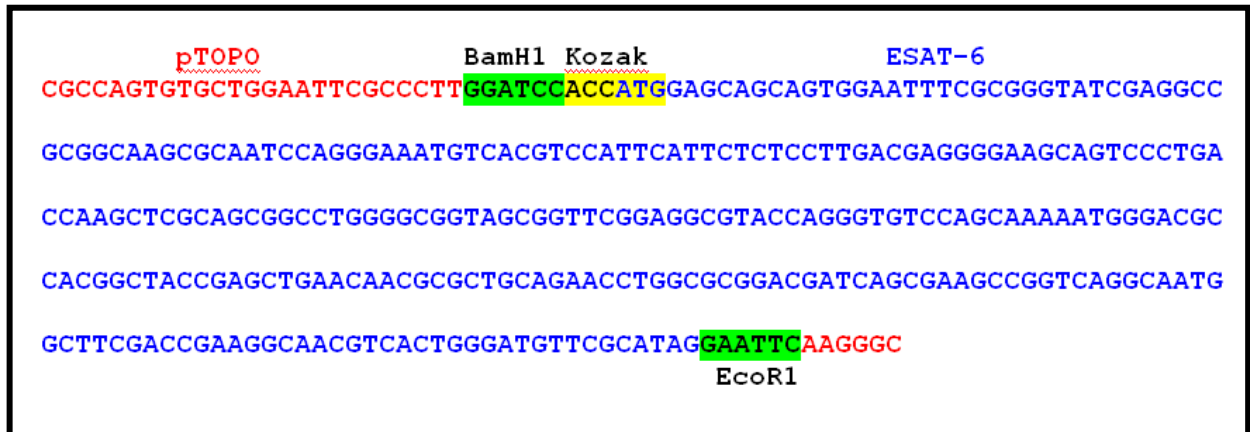


Figura 9: Sequência nucleotídica obtida através do sequenciamento do inserto contido no vetor Zero Blunt® TOPO®, utilizando os primers M13. Sequências em vermelho: Sequências nucleotídicas do vetor Zero Blunt® TOPO®; Sequência em azul: ORF ESAT-6; Sequência em amarelo: sequência de Kozak; Sequências em verde: sítios *Bam*HI e *Eco*RI.

V.1.3 Clonagem da ORF ESAT-6 no vetor pValac

O plasmídeo de expressão eucariótica pValac:*gfp* (Guimarães *et al.*, 2009) foi extraído de *E. coli* e submetido a uma reação de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI para a liberação da ORF *gfp* (704 pb) do vetor pValac. (Figura 10).

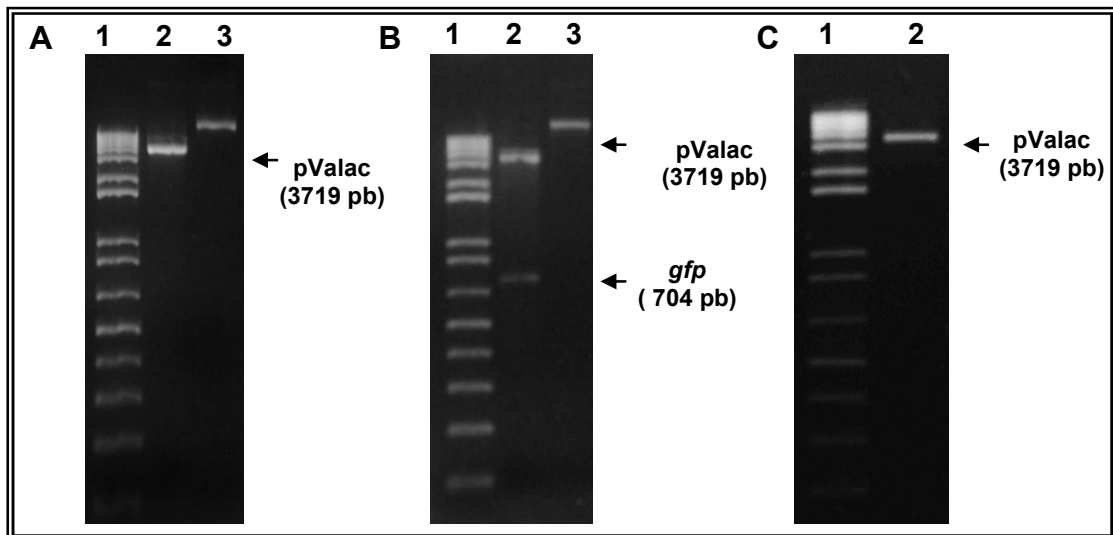


Figura 10: Análise do produto da extração plasmidiana, digestão do pValac:gfp e purificação do vetor pValac. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Análise do produto da extração plasmidiana e Digestão com *EcoRI*: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto linear pValac:gfp (4.446 pb) gerado a partir da digestão com a enzima *EcoRI*; Canaleta 3: Produto pValac:gfp (4.446 pb) gerado a partir da extração plasmidiana de *E. coli*. B) Análise do produto de Digestão enzimática: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da reação de digestão enzimática do pValac:gfp, utilizando-se as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*, resultando em um fragmento de 3.719 pb (pValac) e 704 pb (*gfp*); Canaleta 3: Produto pValac:gfp (4.446 pb) gerado a partir da extração plasmidiana de *E. coli*. C) Análise do produto pValac purificado: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da purificação do pValac (3.719 pb) a partir do gel de agarose apresentado em B.

Simultaneamente, a ORF ESAT-6, também com extremidades coesivas *BamHI* e *EcoRI*, foi purificada a partir do plasmídeo pTP:ESAT-6, para posterior ligação ao vetor pValac purificado (Figura 11).

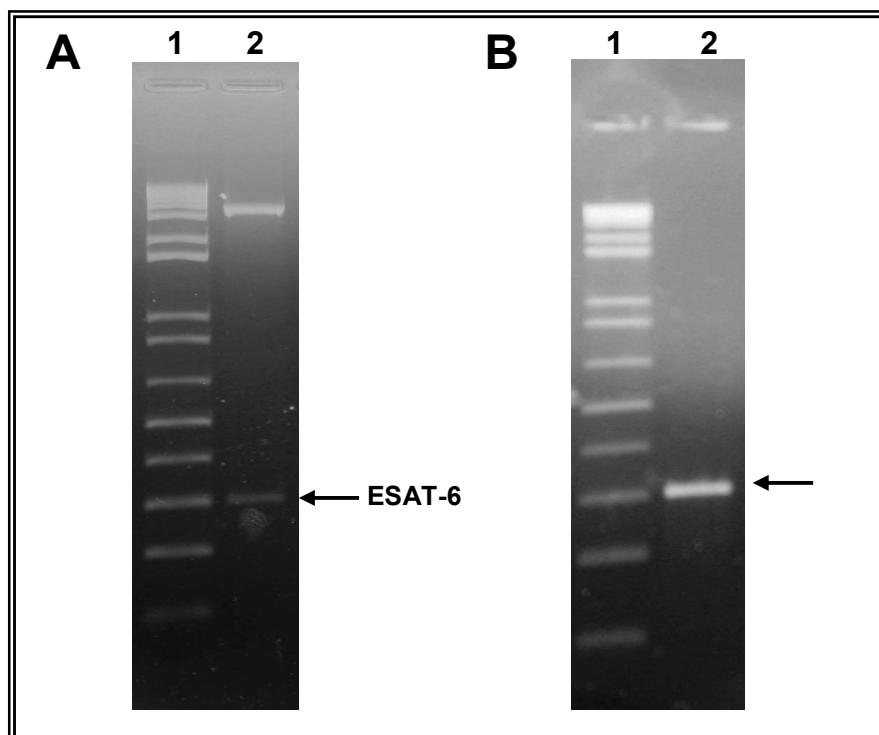


Figura 11: Digestão enzimática do plasmídeo pTP:ESAT-6 com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI e purificação da ORF ESAT-6. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Digestão enzimática do plasmídeo pTP:ESAT-6: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da digestão enzimática, resultando nos fragmentos de 300 pb e 3.470 pb, correspondentes à ORF ESAT-6 e ao vetor Zero Blunt® TOPO®, respectivamente. B) Purificação da ORF ESAT-6: Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Produto da purificação da ORF ESAT-6 a partir da digestão enzimática do pTP:ESAT-6.

Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* TG1. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi realizada em meio LB ágar contendo 10 µg/mL de cloranfenicol. A visualização das colônias foi feita com aproximadamente 18 horas após a transformação. Foram observadas 35 colônias resistentes ao antibiótico. Todas as colônias foram então inoculadas em meio líquido seletivo e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após este período, apenas 4 clones demonstraram crescimento. Estes por sua vez foram estocados em glicerol para posterior extração dos plasmídeos recombinantes. Nenhuma colônia foi visualizada nas placas do controle negativo, onde nenhum DNA foi adicionado às células durante o processo de transformação.

Os DNAs plasmídicos extraídos foram então utilizados como molde numa reação de PCR, utilizando os iniciadores específicos da ORF ESAT-6 de *M. tuberculosis*, para confirmar a presença do inserto no pValac. Dos quatro DNAs plasmídicos iniciais, apenas 2 foram confirmados como sendo portadores do inserto correspondente à ORF ESAT-6 (300 pb). A figura mostra um dos produtos de amplificação da ORF ESAT-6. O controle negativo

da reação, ao qual foi adicionado apenas água milli-Q estéril no lugar do plasmídeo, não demonstrou qualquer sinal de amplificação. O DNA genômico de *M. tuberculosis* foi utilizado para o controle positivo da reação. Além disto, pValac:ESAT-6 foi submetido a uma reação de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, o que resultou em dois fragmentos visíveis: 300 pb e 3.719 pb, correspondentes a ORF ESAT-6 e ao vetor pValac, respectivamente (Figura 12).

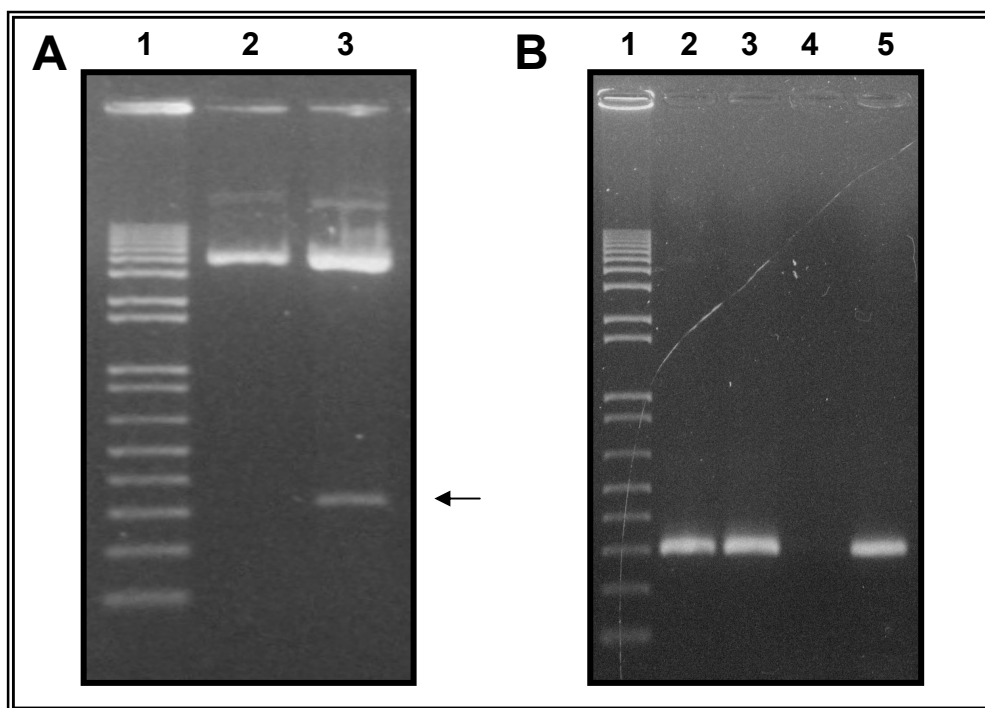


Figura 12: Confirmação da presença da ORF ESAT-6 no vetor pValac por digestão enzimática e PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Confirmação da presença da ORF ESAT-6 no vetor pValac por digestão enzimática. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Plasmídeo pValac:ESAT-6 extraído de um dos 4 clones selecionados; Canaleta 3: Digestão enzimática evidenciando a ORF ESAT-6 com aproximadamente 300 pb. B) Confirmação da presença da ORF ESAT-6 no vetor pValac por PCR de dois clones pValac:ESAT-6. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2 e 3: Amplificação da ORF ESAT-6 por PCR; Canaleta 4: Controle negativo; Canaleta 5: Controle positivo utilizando o DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv.

V.1.3.1 Reação de sequenciamento e análises em sílico

O plasmídeo pValac:ESAT-6 foi extraído dos clones de *E. coli* previamente confirmados por PCR e por digestão enzimática, e um destes clones foi então submetido a reação de sequenciamento do inserto utilizando-se os primers para ESAT-6 (Tabela 4). Assim, um *contig* único da seqüência do clone foi obtido com o programa CAP3 Sequence Assembly, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. A partir desta seqüência otimizada, foi possível confirmar a presença do inserto correspondente à

seqüência codificadora do gene ESAT-6, através de alinhamento (BLASTn) utilizando-se o banco de dados do NCBI. Além disso, através do sequenciamento também foi possível verificar a presença do plasmídeo pValac, através de parte da região promotora deste plasmídeo e da seqüência sinal de poliadenilação (Poli-A) íntegra; além da integridade da seqüência de Kozak e dos sítios de restrição *Bam*Hl e *Eco*Rl no inserto clonado (Figura 9).

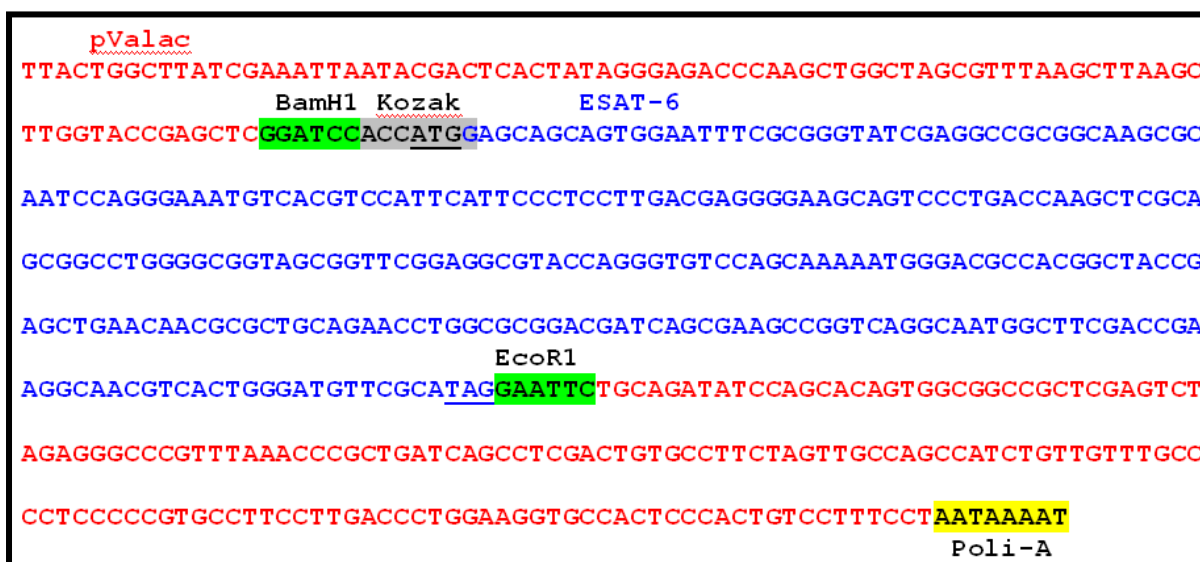


Figura 13: Seqüência nucleotídica obtida através do sequenciamento do inserto contido no vetor pValac. Sequência em vermelho: Sequências nucleotídicas do vetor pValac; Sequência em azul: ORF ESAT-6; Sequência em cinza: Seqüência de Kozak; Sequências em verde: Sítios *Bam*Hl e *Eco*Rl; Sequência em amarelo: Seqüência sinal de poliadenilação (Poli-A). Códons sublinhados: códons de iniciação e término, respectivamente.

Assim, com a obtenção e confirmação do plasmídeo pValac contendo a ORF antigênica ESAT-6 de *M. tuberculosis*, partiu-se então para a avaliação da funcionalidade deste plasmídeo. Como segue, a funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 foi testada, *in vitro*, em uma linhagem celular mamífera, já que este plasmídeo possui um *casset* de expressão eucariótico. Com estes resultados será possível dar continuidade ao projeto, com os experimentos futuros de imunização e avaliação da resposta imune desta possível vacina de DNA contra a TB.

V.2 Verificação da funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 em cultura de células

Uma vez obtido e confirmado o plasmídeo pValac:ESAT-6, o segundo passo deste trabalho consistiu na verificação da funcionalidade deste plasmídeo. Para isto, foram realizados experimentos para detecção da expressão de ESAT-6, por RT-PCR, e da presença da proteína ESAT-6, por *Western Blotting* e Imunocitoquímica.

V.2.1 Padronização da Transfecção Celular com o plasmídeo pValac

Foram testados algumas condições para a padronização e otimização da transfecção celular com o plasmídeo pValac. O reagente lipossômico Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) foi testado nas proporções “DNA(μg):Lipofectamine(μL)” de: 1:2, 1:2,5 e 1:3, sendo verificado visualmente por microscopia de fluorescência que a melhor condição obtida, utilizando-se o pValac:*gfp*, foi a proporção 1:3 de DNA(4 μg):Lipofectamine(12 μL), com avaliação das células entre 48 e 72 horas após a transfecção, intervalo no qual não foi verificada diferença na eficiência de transfecção (Figura 14D e E). A outra condição testada foi não trocar o meio de cultura após 4 horas da transfecção ou troca-lo por o mesmo meio, porém acrescido da suspensão de Antibiótico e Antimicótico. O resultado deste último teste foi que a condição sem trocar o meio levou a melhor expressão da ORF GFP (Figura 14).

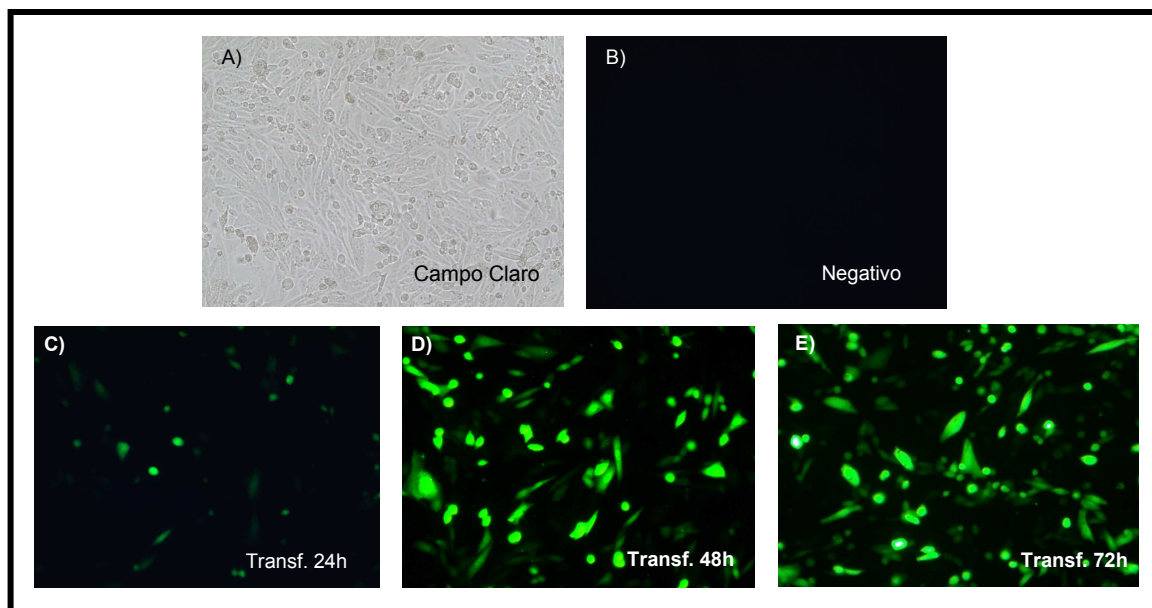


Figura 14: Resultado da padronização da transfecção das células Flp-In™-CHO (Invitrogen) com o plasmídeo pValac:gfp A) Campo claro de células da linhagem CHO; B) Células CHO não transfectadas, com 48h; C) Células transfectadas com pValac:gfp na proporção de DNA (μg):Lipofectamine (μL) de 1:3, após 24 horas da transfecção; D) Células transfectadas com pValac:gfp na proporção de DNA (μg):Lipofectamine (μL) de 1:3, após 48 horas da transfecção; E) Células transfectadas com pValac:gfp na proporção de DNA (μg):Lipofectamine (μL) de 1:3, após 72 horas da transfecção. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 20X e filtro azul (exceto campo claro) em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200.

V.2.2 Verificação da expressão de ESAT-6 por RT-PCR

A transcrição da ORF ESAT-6 em células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 foi verificada, inicialmente, por experimentos de RT-PCR. Para isto, foram testados diversos métodos de extração de RNA após 48h da transfecção, seja com Trizol ou com os Kits citados anteriormente nos Materiais e Métodos, porém em todos os casos houve contaminação do RNA total extraído com DNA plasmidiano (pValac:ESAT-6), não tendo sido possível confirmar a transcrição da ORF codificadora de ESAT-6.

Para o Kit da marca GE, do RNA total extraído obteve-se a concentração de 200 ng/ μL para o RNA total de células transfectadas e 165 ng/ μL para o RNA total de células não transfectadas (controle negativo), sendo que foi possível verificar em gel a presença das bandas 28S e 18S do rRNA (RNA ribossômico) de ambas as amostras, evidenciando assim a integridade do RNA extraído.

Após a reação de transcrição reversa, a partir do RNA extraído de células transfectadas e não transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6, foi realizada uma reação de PCR para verificação da presença do cDNA para a ORF ESAT-6. Porém, não foi possível confirmar isto, pois de acordo com os resultados, e como já mencionado, o RNA

das células transfectadas estava contaminado com o plasmídeo pValac:ESAT-6, já que foram utilizados 4 µg deste em cada poço para transfecção celular.

De acordo com a Figura 15, tanto o RNA total convertido em cDNA (Canaleta 3) quanto o RNA total submetido a uma reação sem a enzima Transcriptase Reversa (Canaleta 4) de células transfectadas com o pValac:ESAT-6 foram amplificados na PCR, amplificando a seqüência de aproximadamente 300pb da ORF ESAT-6, assim como no controle positivo da PCR, onde utilizou-se o plasmídeo pValac:ESAT-6 para a amplificação da ORF (Canaleta 2). O cDNA (Canaleta 5) e o RNA (Canaleta 6) do controle negativo, ou seja, de células não transfectadas, não apresentou nenhuma amplificação, como esperado. Já o controle positivo da RT-PCR, o cDNA do gene GAPDH, foi amplificado corretamente (Canaleta 7), e seu RNA não amplificado (Canaleta 8).

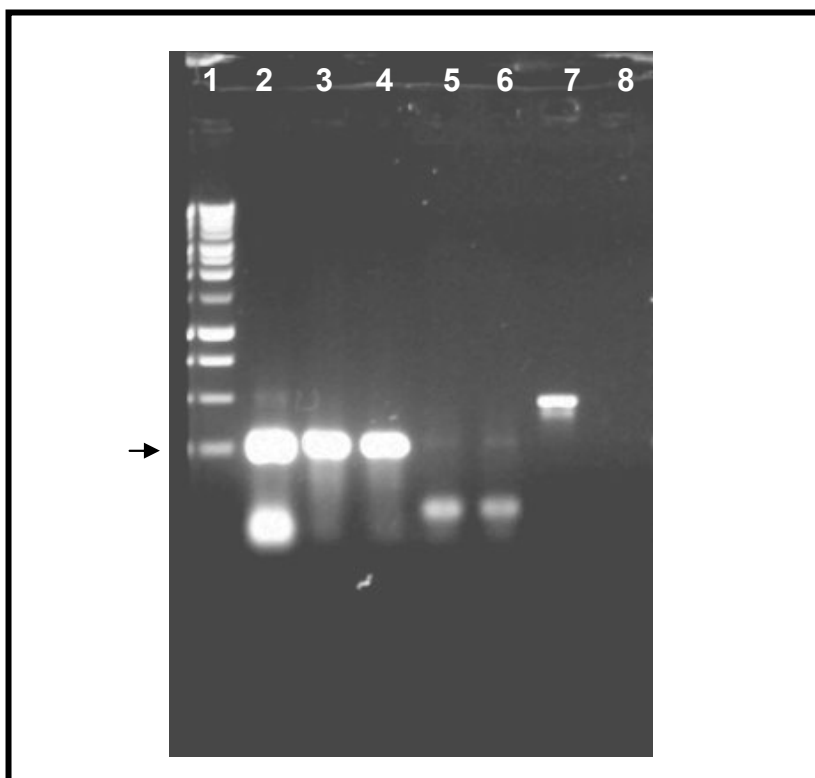


Figura 15: Produtos de PCR obtidos a partir dos cDNAs convertidos ou não do RNA total extraído de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6. Canaleta 1: Marcador 1Kb DNA Ladder (Promega), onde a seta indica o peso molecular de aproximadamente 250 pb; Canaleta 2: Produto de PCR obtido a partir do plasmídeo pValac:ESAT-6; Canaleta 3: Produto de PCR obtido a partir do cDNA convertido do RNA total extraído de células CHO transfectadas com pValac:ESAT-6; Canaleta 4: Produto de PCR obtido a partir do RNA total não convertido em cDNA de células transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6; Canaleta 5: Produto de PCR obtido a partir do cDNA convertido do RNA total de células não transfectadas; Canaleta 6: Produto de PCR obtido a partir do RNA total não convertido em cDNA de células não transfectadas; Canaleta 7: Produto de PCR obtido a partir do cDNA do gene GAPDH (controle positivo); Canaleta 8: Produto de PCR a partir do RNA do gene GAPDH. Primers utilizados nas reações de PCR: primer ESAT-6 (Tabela 4), amplificando 300 pb, exceto no controle positivo do gene GAPDH, onde foi utilizado primers para este gene, obtidos no RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), amplificando 496 pb.

V.2.3 Verificação da produção de ESAT-6 por Western Blotting

Uma vez que não foi possível a detecção da expressão da ORF ESAT-6 por RT-PCR, partiu-se então para a avaliação da capacidade de expressão da proteína ESAT-6 em células CHO, através de experimentos de *Western Blotting* utilizando o anticorpo anti-ESAT-6 para a imunodeteção da proteína recombinante após 48 horas da transfecção com o plasmídeo pValac:ESAT-6. Para tanto, as alíquotas protéicas extraídas das culturas celulares transfectadas e não transfectadas com o respectivo plasmídeo foram analisadas em gel de poliácridamida e transferidas para membranas para posterior imunodeteção.

Em um experimento piloto, através de análises por SDS-PAGE e utilizando-se o método de coloração por nitrato de prata para a visualização das proteínas totais no gel, não foi possível a visualização de nenhuma banda na altura do peso molecular esperado de 6 KDa para ESAT-6, não sendo possível visualizar diferença em gel no padrão protéico total extraído das culturas celulares transfectadas e não transfectadas.

Nas análises de imunodeteção por *Western Blotting* também não foi possível a visualização da proteína ESAT-6, onde nenhuma proteína foi identificada na altura do peso molecular esperado para ESAT-6 de 6 KDa (Figura 16). Segundo dados da literatura e também por comunicação pessoal (Innocentin *et al.*, 2009; Guimarães *et al.*, 2009; J.M. Chatel, comunicação pessoal), estes resultados já eram esperados, haja vista que a expressão de GFP, a partir do vetor pValac:gfp, sempre foi confirmada apenas por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (FACS – “Fluorescent Activated Cell Sorter”). Apesar de alguns trabalhos já terem identificado a proteína ESAT-6 por *Western Blotting*, esta foi expressa em diferentes condições, como vetores e linhagens celulares diferentes dos aqui utilizados (Xu *et al.*, 2008). A maioria dos trabalhos que detectaram a proteína ESAT-6 por este método a utiliza em fusão a outras proteínas, como ESAT-6/MPT64 e CFP10/ESAT6 (Bai *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006b), o que consequentemente facilita sua visualização por apresentarem um peso molecular maior. Além disso, a utilização da maquinaria bacteriana para a produção de ESAT-6 ou ainda a clonagem das proteínas fundidas a cauda de histidina para purificação por cromatografia de afinidade podem também aumentar e facilitar a imunodeteção por *Western Blotting* (Bai *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006b).

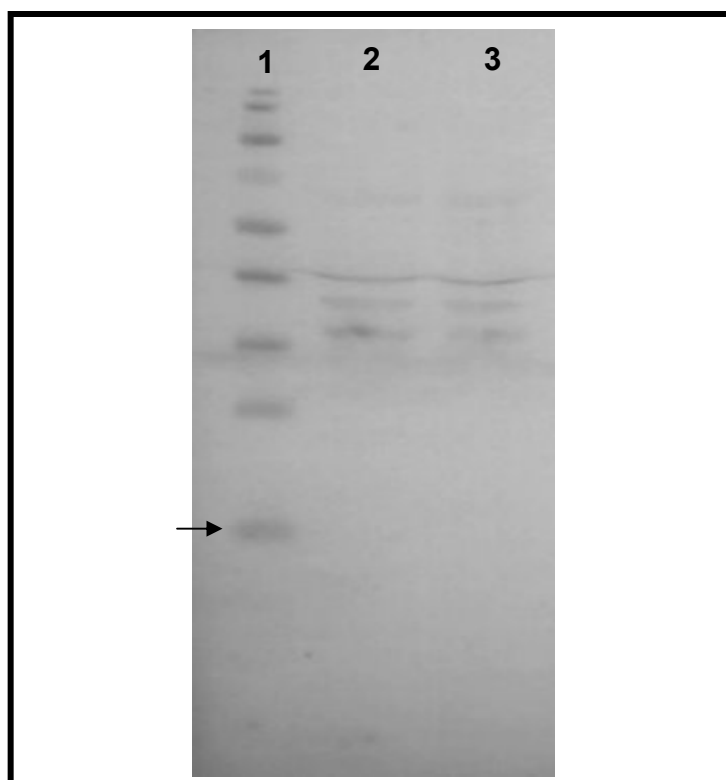


Figura 16: Western Blotting realizado a partir do extrato protéico de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6. Canaleta 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas), onde a seta indica o peso molecular de 15 KDa; Canaleta 2: Extrato protéico de células CHO transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6; Canaleta 3: Extrato protéico de células CHO não transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 (controle negativo).

V.2.4 Verificação da produção de ESAT-6 por Imunocitoquímica

V.2.4.1 Marcação com Fitc

Assim, seguiu-se com experimentos de imunocitoquímica para a verificação da produção de ESAT-6, já que não foi possível confirmar a funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6 nos experimentos anteriores. Através da marcação com FITC foi possível verificar a expressão da proteína ESAT-6 após 48 horas da transfecção das células CHO com o vetor pValac:ESAT-6 (Figura 17B), evidenciando, assim, a funcionalidade do plasmídeo em células eucarióticas, apesar da eficiência da transfecção geral não tenha sido satisfatória, tanto para a ORF GFP quanto para ESAT-6. Como controle negativo do experimento, células CHO não transfetadas foram marcadas nas mesmas condições, ou seja, utilizando-se o anticorpo primário anti-ESAT-6 e o secundário ligado ao fluorocromo FITC, onde nenhuma fluorescência foi visualizada (Figura 17D). Células CHO transfetadas com pValac:ESAT-6 também foram marcadas somente com o anticorpo secundário, para verificação de alguma ligação cruzada e inespecífica do mesmo, sendo que nenhuma fluorescência considerável foi visualizada (Figura 17C). Assim, pôde-se confirmar a

expressão da proteína ESAT-6 em células transfectadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 e consequentemente a funcionalidade do mesmo.

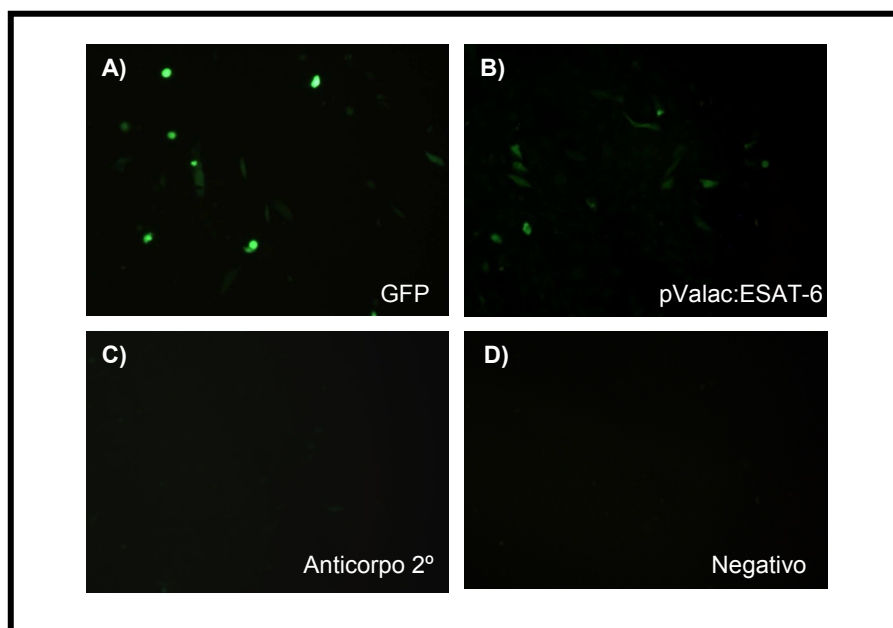


Figura 17: Verificação da produção de ESAT-6 em células transfectadas pelo plasmídeo pValac:ESAT-6 por Imunofluorescência. A) Células CHO transfectadas com pValac:gfp; B) Células CHO transfectadas com pValac:ESAT-6 e incubadas com anticorpo primário anti-ESAT-6 e anticorpo secundário, contendo o fluorocromo FITC; C) Células CHO transfectadas com pValac:ESAT-6 e incubadas somente com o anticorpo secundário, contendo o fluorocromo FITC; D) Células CHO não transfectadas e incubadas com anticorpo primário anti-ESAT-6 e anticorpo secundário, contendo o fluorocromo FITC. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 20X em microscópio de fluorescência invertido Zeiss Axiovert 200.

V.2.4.2 Marcação com Alexa 488

Para se assegurar dos resultados anteriormente obtidos e também para a obtenção de melhores imagens das células CHO expressando o antígeno ESAT-6, foi realizado também a marcação destas com Alexa 488 para visualização em Microscopia Confocal. Através da marcação com Alexa Flúor 488 também foi possível verificar a presença da proteína ESAT-6, após 64 horas da transfecção com o plasmídeo pValac:ESAT-6, evidenciando assim a funcionalidade do vetor em células eucarióticas. Através da sobreposição das imagens (Figura 18A e B), resultando na Figura 18C, pôde-se visualizar a marcação da proteína ESAT-6 com Alexa Flúor 488 em verde e do núcleo com DAPI em azul. Além disto, na Figura 18C é possível verificar algumas células expressando ESAT-6 e outras não, já que a transfecção celular não foi de 100%. Como controle negativo do anticorpo secundário Alexa 488, células CHO transfectadas foram marcadas somente com o anticorpo secundário, para verificação de alguma ligação cruzada e inespecífica do mesmo,

sendo que nenhuma fluorescência no comprimento de onda da cor verde foi visualizada, resultando na imagem sobreposta onde apenas o núcleo de todas as células está marcado em azul (Figura 18D). Assim, pode-se confirmar a expressão da proteína ESAT-6 em células transfectadas e conseqüentemente a funcionalidade do plasmídeo pValac:ESAT-6.

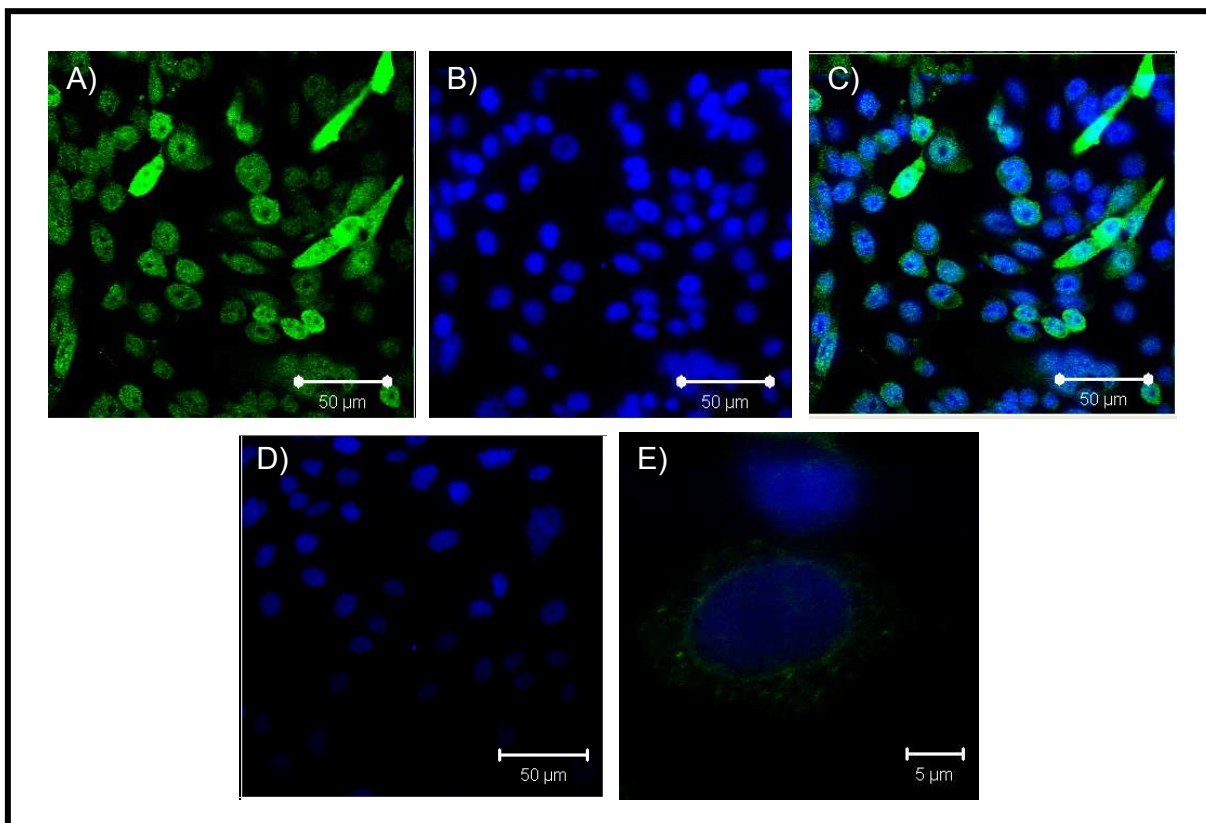


Figura 18: Verificação da produção de ESAT-6 por Imunocitoquímica utilizando-se Microscopia Confocal. A) Células CHO transfectadas com pValac:ESAT-6 e incubadas com anticorpo primário anti-ESAT-6, anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e DAPI para marcação do núcleo, capturando apenas Alexa 488; B) Células CHO transfectadas com pValac:ESAT-6 e incubadas com anticorpo primário anti-ESAT-6, anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e DAPI para marcação do núcleo, capturando apenas o DAPI; C) Sobreposição das imagens A e B, onde pôde-se visualizar a marcação da proteína ESAT-6 com Alexa Fluor 488 e do núcleo com DAPI; D) Imagem sobreposta de células CHO transfectadas com pValac:ESAT-6 e incubadas somente com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 e DAPI; E) Sobreposição das imagens A e B ampliadas, onde pôde-se visualizar a marcação da proteína ESAT-6 com Alexa Fluor 488 e do núcleo com DAPI, em uma única célula. Todas as imagens foram obtidas em objetiva de 63X com óleo de imersão, utilizando-se o Microscópio de Varredura a Laser Confocal, modelo LSM 510 Meta Zeiss.

V.3 Construção da linhagem FnBPA de *L. lactis* contendo o plasmídeo pValac:ESAT-6

V.3.1 Obtenção das linhagens invasivas *L. lactis* pValac:ESAT-6 e *L. lactis* pValac:gfp

Assim confirmada a construção do plasmídeo vacinal pValac:ESAT-6 e verificada sua funcionalidade *in vitro*, este pôde ser utilizado para dar continuidade ao projeto, seguindo-se com a clonagem do pValac:ESAT-6 na linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA; o que representa um primeiro passo rumo ao desenvolvimento de uma nova vacina gênica oral contra a TB baseada em BL recombinantes.

Para isto, o clone *E. coli* pValac:ESAT-6, previamente confirmado por PCR, digestão enzimática e sequenciamento (item V.1.3), foi utilizado para prosseguir com os processos de transformação de *L. lactis* FnBPA. O DNA plasmidiano foi então extraído (pValac:ESAT-6) e utilizado para transformar células eletrocompetentes de *L. lactis* FnBPA. Para utilização como controle positivo nos experimentos futuros, a linhagem de *L. lactis* FnBPA também foi transformada com o vetor pValac:gfp.

A seleção de colônias recombinantes foi feita em meio M17-Sac-Gli suplementado com Cm e Ery, para a seleção do pValac e pOri23:FnbA, respectivamente. Após, aproximadamente, 24 horas de crescimento, um número incotável de clones pôde ser visualizado, tanto para as células transformadas com o plasmídeo pValac:ESAT-6 quanto para as células transformadas com o plasmídeo pValac:gfp.

Três colônias isoladas de *L. lactis* FnBPA contendo o plasmídeo pValac:ESAT-6 [*L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6)] e três colônias isoladas de *L. lactis* FnBPA contendo o plasmídeo pValac:gfp [*L. lactis* FnBPA(pValac:gfp)] foram inoculadas em meio líquido seletivo e as culturas de cada possível clone foram congeladas e submetidas aos processos de extração do DNA plasmidiano.

Os plasmídeos extraídos de cada colônia foram utilizados em uma reação de PCR utilizando os iniciadores específicos para a ORF ESAT-6 e os iniciadores próprios do plasmídeo pValac para a amplificação de *gfp* (tabela 5). Foram confirmados os três clones testados como sendo portadores do plasmídeo pValac:ESAT-6 e os três do plasmídeo pValac:gfp, com ampliações de 300 pb e 807 pb, respectivamente (Figura 19A).

Na Figura 19B, foi possível verificar a presença de pOri23:FnbA (Tabela 3) na linhagem invasiva de *L. lactis*, com a amplificação de 860 pb, parte da ORF FnBPA, por PCR com os primers FnAF e FnAR (Tabela 5). Tanto a linhagem transformada com o pValac:ESAT-6 quanto a transformada com pValac:gfp apresentaram a amplificação de parte da ORF FnBPA, onde verificou-se novamente a presença de *ESAT-6* e *gfp*, porém agora amplificados com os primers ValF e ValR (tabela 5), levando a um aumento de 156 pb

no tamanho da ORF ESAT-6, por se anelar distante do sítio de clonagem no plasmídeo pValac.

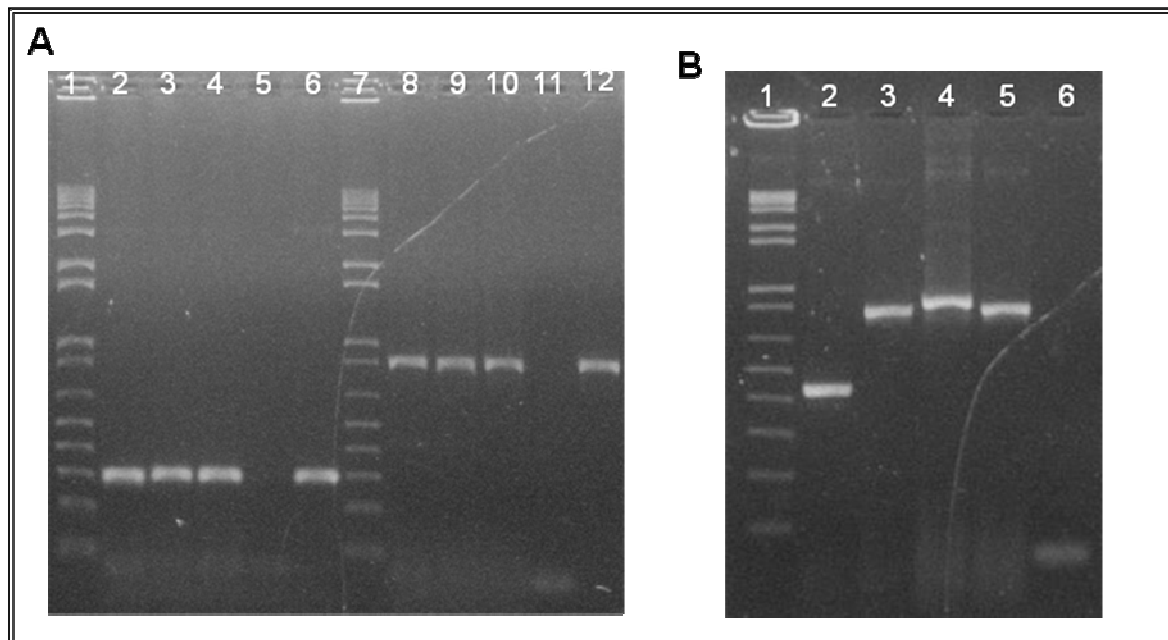


Figura 19: Confirmação das transformações de *L. lactis* FnBPA com o plasmídeo pValac:ESAT-6 ou pValac:gfp. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. A) Amplificação das ORFs ESAT-6 e *gfp*. Canaleta 1 e 7: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2, 3 e 4: Confirmação de três clones *L. lactis* FnBPA pValac:ESAT-6, por amplificação da ORF ESAT-6 (300 pb) com os primers para ESAT-6 descritos na Tabela 5; Canaleta 5: Controle negativo com os primer ESAT-6; Canaleta 6: Controle positivo com o plasmídeo pValac:ESAT-6 e os primer ESAT-6; Canaleta 8, 9 e 10: Confirmação de três clones *L. lactis* FnBPA pValac:gfp, por amplificação da ORF *gfp* (807 pb) com os primers ValF e ValR descritos na Tabela 5; Canaleta 11: Controle negativo com os primer ValF e ValR; Canaleta 6: Controle positivo com o plasmídeo pValac:gfp e os primer ValF e ValR. B) Amplificação das ORFs ESAT-6, *gfp* e FnBPA. Canaleta 1: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: Amplificação de ESAT-6 com os primers ValF e ValR (456 pb); Canaleta 3: Amplificação de parte da ORF FnBPA (807 pb) do clone 1 de *L. lactis* FnBPA pValac:ESAT-6 com os primers FnAF e FnAR; Canaleta 4: Amplificação de *gfp* (860 pb) com os primers ValF e ValR; Canaleta 5: Amplificação de parte da ORF FnBPA (807 pb) do clone 1 de *L. lactis* FnBPA pValac:gfp com os primers FnAF e FnAR; Canaleta 6: Controle negativo utilizando os primer ValF, ValR, FnAF e FnAR sem acréscimo de nenhum DNA à reação.

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

VI. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

VI.1 Conclusões

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

- A ORF ESAT-6 foi corretamente clonada no vetor pValac, sendo sua integridade nucleotídica confirmada;
- O plasmídeo pValac:ESAT-6 mostrou-se funcional em células eucarióticas, sendo o antígeno de interesse ESAT-6 expresso em células transfectadas com o plasmídeo;
- A linhagem de *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) foi obtida e confirmada para posteriores experimentos de invasão e imunização contra a TB experimental.

VI.2 Perspectivas

A construção do plasmídeo pValac:ESAT-6 de forma funcional e capaz de permitir a expressão de ESAT-6 em células eucarióticas, gerando o antígeno imunodominante ESAT-6 de *M. tuberculosis in vitro*, e a obtenção da linhagem invasiva *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) no presente trabalho, abre perspectivas para a continuidade deste projeto, primeiramente para a avaliação da capacidade invasiva da linhagem, *in vitro* e *in vivo*, seguindo-se com experimentos de utilização de *L. lactis* FnBPA(pValac:ESAT-6) como um veículo para a entrega do pValac:ESAT-6 *in vivo*, imunizando-se camundongos via oral e avaliando-se a resposta imune celular e humoral gerada por esta possível vacina de DNA em desenvolvimento.

Assim, este projeto constitui um primeiro passo rumo à validação da eficácia e efetividade de novas vacinas gênicas baseadas em bactérias lácticas geneticamente modificadas, por via de administração em mucosas; o que também poderá fornecer informações valiosas para a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas contra outros patógenos.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, P.; Askgaard, D.; Ljungqvist, L.; Bennedsen, J.; Heron, I. (1991) Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect. Immun.* 59, 1905–1910.

Andersen, P.; Andersen, A.B.; Sorensen, A.L.; Nagai, S. (1995) Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Immunol.* 154, 3359–3372.

Angel, J.B.; Cooper, C.L.; Clinch, J.; Young, C.D.; Chenier, A.; Parato, K.G.; Lautru, M.; Davis, H.; Cameron, D.W. (2008) CpG increases vaccine antigen-specific cell-mediated immunity when administered with hepatitis B vaccine in HIV infection. *J Immune Based Ther Vaccines*; 6:4.

Atanasiu, P.; Orth, G.; Dragonas P. (1962) Delayed specific antitumoral resistance in the hamster immunized shortly after birth with the polyoma virus. *C R Hebd Seances Acad Sci*; 254:2250-2.

Azevedo, V. and Miyoshi, A. (2004) Novas utilizações Biotecnológicas e terapêuticas das Bactérias do Ácido Láctico, cap. 40 (p. 801-818) In *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu (1114 p.).

Azevedo, V. and Oliveira, S.C. (2003) Vacinas de DNA in Borém, Almeida e Santos: Biotecnologia de A a Z. Universidade Federal de Viçosa, MG.

Bagarazzi, M.L.; Boyer, J.D.; Javadian, M.A.; Chattergoon, M.; Dang, K.; Kim, G.; Shah, J.; Wang, B.; Weiner, D.B. (1997) Safety and immunogenicity of intramuscular and intravaginal delivery of HIV-1 DNA constructs to infant chimpanzees. *J. Med. Primatol.* Feb-Apr;26(1-2):27-33.

Bahey-El-Din M. and Gahan, C.G. (2010a) *Lactococcus lactis*: from the dairy industry to antigen and therapeutic protein delivery. *Discov Med.* May;9(48):455-61.

Bahey-El-Din M.; Gahan C.G.; Griffin B.T. (2010b) *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins. *Curr Gene Ther* 10(1):34-45.

Bai, Y.; Xue, Y.; Gao, H.; Wang, L.; Ding, T.; Bai, W.; Fan, A.; Zhang, J.; An, Q.; Xu, Z. (2008) Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. *Protein Expr Purif.* Jun;59(2):189-96. Epub 2007 Dec 15.

Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.

Barrera, L. (2007) The Basics of Clinical Bacteriology. In: Palomino, J. C.; Leão, S. C.; Ritacco, V. *Tuberculosis 2007- From basic science to patient care*. Belgium, Brazil, Argentina. www.TuberculosisTextbook.com . p. 93-112.

Barouch, D.H.; Yang, Z.Y.; Kong, W.P.; Koriath-Schmitz, B.; Sumida, S.M.; Truitt, D.M.; Kishko, M.G.; Arthur, J.C.; Miura, A.; Mascola, J.R.; Letvin, N.L.; Nabel, G.J. (2005) A human T -cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human

immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates. *J. Virol.* Jul; 79(14):8828-34.

Baumann, S.; Eddine, A.N.; Kaufmann, S.H.E. (2006). Progress in tuberculosis vaccine development. *Science.* 18:438-448

Becker, P.D.; Noerder, M.; Guzmán, C.A. (2008) Genetic Immunization: Bacteria as DNA vaccine delivery vehicle. Capítulo 6 (71-97) In Sleator, R. e Hill, C. *Patho-biotechnology: Biotechnology intelligence unit.* Landes Bioscience, 216 p.

Behr, M.A.; Wilson, M.A.; Gill, W.P.; Salamon, H.; Schoolnik, G.K.; Rane, S.; Small, P.M. (1999) Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarrays. *Science* 284, 1520–1523.

Benihoud, K.; Yeh, P.; Perricaudet, M. (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 440–447.

Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; Cortez-Perez, N.; Gruss, A.; Tamez-Guerra, R.S.; Oliveira, S.C.; Saucedo-Cardenas, O.; Montes de Oca-Luna, R.; Le Loir, Y. (2003a) Intranasal administration of recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine Interleukine-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production, *Infect. Immun.* 71 1887–1896.

Bermúdez-Humarán, L.G.; Langella, P.; L'Haridon, R.; Gilbert, S.; Commissaire, J.; Le Loir, Y.; Corthier, G. (2003b) Controlled intra- and extracellular production of staphylococcal nuclease and ovine omega interferon in *Lactococcus lactis*, *FEMS Microbiol. Lett.* 229 37–42.

Bermúdez-Humarán, L.G.; Corthier, G.; Langella, P. R. (2004) Recent advances in the use of *Lactococcus lactis* as live recombinant vector for the development of new safe mucosal vaccines. *Recent Res. Devel. Microbiology.* 8:147-160.

Berthet, F.X.; Rasmussen, P.B.; Rosenkrands, I.; Andersen, P.; Gicquel, B. (1998) A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low- molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144, 3195–3203.

Besse, F. and Ephrussi, A. (2008) Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 9:971-80.

Bolotin, A.; Wincker, P.; Mauger, S.; Jaillon, O.; Malarme, K.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S.D.; Sorokin, A. (2001) The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731–753.

Braat, H.; Rottiers, P.; Hommes, D.W.; Huyghebaert, N.; Remaut, E.; Remon, J.P.; van Deventer, S.J.; Neiryck, S.; Peppelenbosch M.P.; Steidler, L. (2006) A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(6):754-9.

Brandt, L.; Elhay, M.; Rosenkrands, I.; Lindblad, E.B.; Andersen, P.; (2000) ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 68, 791–795.

Brandt, L.; Oettinger, T.; Holm, A.; Andersen, A.B.; Andersen, P. (1996) Key epitopes on the ESAT-6 antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 157, 3527–3533.

- Brave, A.; Hallengard, D.; Schroder, U.; Blomberg, P.; Wahren, B.; Hinkula, J. (2008) Intranasal immunization of young mice with a multigene HIV-1 vaccine in combination with the N3 adjuvant induces mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*; 26:5075-8.
- Brewer, T.F. (2000) Preventing tuberculosis with Bacillus Calmette Guerin vaccine: a meta-analysis of the literature. *Clin Infect Dis.* 31:64–7.
- Britton, J.W. and Palendira, U. (2003) Improving vaccines against tuberculosis. *Immunology and cell Biology.* 50:34-35.
- Brodin, P.; Rosenkrands, I.; Andersen, P.; Cole, S. T.; Brosch, R. (2004) ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol.* 12:500–508.
- Brodin, P.; Eiglmeier, K.; Marmiesse, M.; Billault, A.; Garnier, T.; Niemann, S.; Cole, S. T.; Brosch, R. (2002) Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect. Immun.* 70, 5568–5578.
- Brusasca, P.N.; Peters, R.L.; Motzel, S.; Klein, H.J.; Gennaro, M.L. (2003) Antigen recognition by serumantibodies in non-human primates experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp. Med.* 53, 165–172.
- Bukrinsky, M.I.; Sharova, N.; Dempsey, M.P.; Stanwick, T.L.; Bukrinsky, A.G.; Haggerty, S.; Stevenson, M. (1992) Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6580–6584.
- Burgess, C.; O'Connell-Motherway, M.; Sybesma, W.; Hugenholtz, J.; van Sinderen D. (2004) Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods. *Appl Environ Microbiol* 70:5769–5777.
- Camus, J.C.; Pryor, M.J.; Médigue, C.; Cole, S.T. (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* 148(Pt 10):2967-73.
- Capone, S.; Zampaglione, I.; Vitelli, A.; Pezzanera, M.; Kierstead, L.; Burns, J.; Ruggeri, L.; Arcuri, M.; Cappelletti, M.; Meola, A.; Ercole, B.B.; Tafi, R.; Santini, C.; Luzzago, A.; Fu, T.M.; Colloca, S.; Ciliberto, G.; Cortese, R.; Nicosia, A.; Fattori, E.; Folgori, A. (2006) Modulation of the immune response induced by gene electrotransfer of a hepatitis C virus DNA vaccine in nonhuman primates. *J Immunol*; 177:7462-71.
- Carpenter, Z.K.; Williamson, E.D.; Eyles, J.E. (2005) Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu *Journal of Controlled Release* 104, 67–77
- Cattamanichi, A.; Posavad, C.M.; Wald, A.; Baine, Y.; Moses, J.; Higgins, T.J.; Ginsberg, R.; Ciccarelli, R.; Corey, L.; Koelle, D.M. (2008) Phase I study of a herpes simplex virus type 2 (HSV-2) DNA vaccine administered to healthy, HSV-2-seronegative adults by a needle-free injection system. *Clin Vaccine Immunol*; 15:1638-43.
- Cerning, J. (1990) Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 87:113–130.
- Chang-hong, S.; Xiao-wu, W.; Hai, Z.; Ting-fen, Z.; Li-mei, W.; Zhi-kai, X. (2008) Immune Responses and Protective Efficacy of the Gene Vaccine Expressing Ag85B and ESAT6 Fusion Protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA and Cell Biology* Volume 27, Number 4, Mary Ann Liebert, Inc. Pp. 199–207

- Chatel, J.M.; Langella, P.; Adel-Patient, K.; Commissaire, J.; Wal, J.M.; Corthier, G. (2001). Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine beta-lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8(3):545-51.
- Chatel, J.M.; Pothelune, I.; Ah-Leung, S.; Corthier, G; Wal, J.M.; Langella, P. (2008) In vivo transfer of plasmid from food-grade transiting lactococci to murine epithelial cells. *Gene Therapy*, 1–7.
- Chong, S.Y.; Egan, M.A.; Kutzler, M.A.; Megati, S.; Masood, A.; Roopchand, V.; Garcia-Hand, D.; Montefiori, D.C.; Quiroz, J.; Rosati, M., Schadeck, E.B.; Boyer, J.D.; Pavlakis, G.N.; Weiner, D.B.; Sidhu, M.; Eldridge, J.H.; Israel, Z.R. (2007) Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV(89.6P) challenge in rhesus macaques. *Vaccine*; 25:4967-82.
- Chopin, A.; Chopin, M.C.; Moillo-Batt, A.; Langella, P. (1984) Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. *Plasmid*; 11: 260:263.
- Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S.V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C.E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M.A.; Rajandream, M.A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J.E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. Jun 11; 393(6685):537-44.
- Condon, C.; Watkins, S.C.; Celluzzi, C.M.; Thompson, K.; Falo, L.D. Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med.* Oct; 2 (10):1122-8
- Courvalin, P.; Goussard, S.; Grillot-Courvalin, C.; (1995) Gene transfer from bacteria to mammalian cells. *C.R. Acad. Sci. III* 318, 1207–1212.
- Cox, G.J.M.; Zamb, T.J.; Babiuk, L.A. (1993) Bovine herpesvirus 1: immune response in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol*; 67:5664–7.
- Cranenburgh, R.M.; Hanak, J.A.; Williams, S.G.; Sherratt, D.J. (2001) *Escherichia coli* strains that allow antibiotic-free plasmid selection and maintenance by repressor titration. *Nucleic Acids Res.* 29, E26.
- Dale, C.J.; Thomson, S.; De Rose, R.; Ranasinghe, C.; Medveczky, C.J.; Pamungkas, J.; Boyle, D.B.; Ramshaw, I.A.; Kent, S.J. (2006) Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol Med*; 127:171-97.
- Danko, I.; Williams, P.; Herweijer, H.; Zhang, G.; Latendresse, J.S.; Bock, I.; Wolff, J.A. (1997) High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum. Mol. Genet. Sep*; 6(9) : 1435-43.
- Daudel, D.; Weidinger, G.; Spreng, S. (2007). Use of attenuated bacteria as delivery vectors for DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines*.6: 97-110.
- Dean, D.A.; Dean, B.S.; Muller, S.; Smith, L.C. (1999) Sequence requirements for plasmid nuclear entry, *Exp. Cell Res.* 253, 713–722.

- Dean, D.A. (1997) Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific, *Exp. Cell Res.* 230, 293–302
- Delavallee, L.; Assier, E.; Denys, A.; Falgarone, G.; Zagury, J.F.; Muller, S.; Bessis, N.; Boissier, M.C. (2008) Vaccination with cytokines in autoimmune diseases. *Ann Med*; 40:343-51.
- Deplancke, B.; Gaskins, H. R. (2002) Redox control of the transsulfuration and glutathione biosynthesis pathways. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:85–92
- Derrick, S.C. and Morris, S.L.. (2007) The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression *Cellular Microbiology* 9(6), 1547–1555.
- De Vos, W.M. (1999) Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*;2: 289-295.
- De Vos, W.M. and Gasson, M.J. (1989) Structure and expression of the *Lactococcus lactis* gene for phospho-beta-galactosidase (lacG) in *Escherichia coli* and *L. lactis*. *J. Gen. Microbiol.*; 135: 1833-1846.
- De Vuyst, L.; Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:194–199
- Dietrich, J.; Weldingh, K.; Andersen, P. (2006) Prospects for a novel vaccine against tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 112 163–169.
- Dietrich, J.; Andersen, C.; Rappuoli, R.; Doherty, T.M.; Jensen, C.G. Andersen, P. (2006) Mucosal Administration of Ag85B-ESAT-6 Protects against Infection with *Mycobacterium tuberculosis* and Boosts Prior *Bacillus Calmette-Guerin* Immunity. *J. Immunol.*;177;6353-6360
- Dietrich, J.; Billeskov, R.; Doherty, T.M.; Andersen, P. (2007) Synergistic Effect of *Bacillus Calmette Guerin* and a Tuberculosis Subunit Vaccine in Cationic Liposomes: Increased Immunogenicity and Protection. *J. Immunol.*;178;3721-3730
- Dissel, J.T.V.; Arend, S.M.; Prins, C.; Bang, P.; Tingskov, P.N.; Lingnau, K.; Nouta, J.; Klein, M.R.; Rosenkrands, I. Ottenhoff, T.H.M.; Kromann, I.; Doherty, T.M.; Andersen, P. (2010) Ag85B–ESAT-6 adjuvanted with IC31® promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naïve human volunteers. *Vaccine* 28, 3571–3581
- Dieye, Y.; Usai, S.; Clier, F.; Gruss, A.; Piard, J.C. (2001) Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 183, 4157- 4166.
- Donnelly, J.; Berry, K.; Ulmer, J.B. (2003) Technical and regulatory hurdles for DNA vaccines. *Int J Parasitol*; 33:457-67.
- Dunham, S.P. (2002). The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci.*73: 9–16.
- Duwat, P.; Cesselin, B.; Sourice, S.; Gruss, A. (2000) *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival. *Int. J. Food Microbiol.*; 55: 83-86.

- Elhay, M.J.; Oettinger, T.; Andersen, P. (1998) Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect. Immun.* 66, 3454–3456.
- Fan, X.; Gao, Q.; Fu, R. (2007) DNA vaccine encoding ESAT-6 enhances the protective efficacy of BCG against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Scand J Immunol.* Nov;66(5):523-8. Epub 2007 Oct 3.
- Fasbender, A.; Zabner, J.; Zeiher, B.G.; Welsh, M.J. (1997) A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia, *Gene Ther.* 4, 1173–1180
- Feltquate, D.M. (1998) DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J Cell Biochem; S30–31:304–11.*
- Ferrera, F.; La Cava, A.; Rizzi, M.; Hahn, B.H.; Indiveri, F.; Filaci, G. (2007) Gene vaccination for the induction of immune tolerance. *Ann N Y Acad Sci; 1110:99-111.*
- Fuller, D.H.; Loudon, P.; Schmaljohn, C. (2006) Preclinical and clinical progress of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases. *Methods; 40:86-97.*
- Gaillard, J.L.; Berche, P.; Frehel, C.; Gouin, E.; Cossart, P. (1991) Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci, *Cell* 65 1127–1141.
- Gao, H.; Yue, Y.; Hu, L.; Xu, W.; Xiong, S. (2009a) A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes casted in a natural structure (ECANS) confers protective immunity against pulmonary mycobacterial challenge. *Vaccine* 27, 5313–5319
- Gao, H.; Li, K.; Yu, S.; Xiong, S. A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes cast in a natural structure elicits enhanced Th1 immunity compared with BCG. *Microbiol Immunol* 2009b; 53: 541–549
- Garmory, H.S.; Leckenby, M.W.; Griffin, K.F.; Elvin, S.J.; Taylor, R.R.; Hartley, M.G.; Hanak, J.A.; Williamson, E.D.; Cranenburgh, R.M. (2005) Antibiotic-free plasmid stabilization by operator-repressor titration for vaccine delivery by using live *Salmonella enterica* Serovar typhimurium. *Infect. Immun.* Apr;73(4):2005-11
- Gasson, M.J. (1983a) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic acid streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154, 1–9.
- Gasson, M.J. (1983b) Genetic transfer systems in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek; 49(3):275-82.*
- Gey van Pittius, N.C.; Gamielien, J.; Hide, W.; Brown, G.D.; Siezen, R.J.; Beyers, A.D. (2001) The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram positive bacteria. *Genome Biol; 2 (10):1–18.*
- Ginsberg, A.M. (2002) What's new in tuberculosis vaccines? *Bull World Health Organ.* 80(6):483-488.
- Gordon, S.V.; Brosch, R.; Billault, A.; Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Cole, S.T. (1999) Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32, 643–656.

- Greber, U.F. and Kasamatsu, H. (1996) Nuclear targeting of SV40 and adenovirus, *Trends Cell Biol.* 6, 189–195.
- Grillot-Courvalin, C.; Goussard, S.; Courvalin, P. (1999) Bacteria as gene delivery vectors for mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* 1999.10: 477–481.
- Guimarães, V.D.; Innocentin, S.; Lefèvre, F.; Azevedo, V.; Wal, J.M.; Langella, P.; Chatel, J.M. (2006) Use of Native Lactococci as Vehicles for Delivery of DNA into Mammalian Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, Nov., p. 7091–7097
- Guimarães, V.; Innocentin, S.; Chatel, J.M.; Lefevre, Langella.; Azevedo, V.; Miyoshi, A. (2009) A new plasmid vector for DNA delivery using lactococci. *Genetic Vaccines and Therapy.* 7:4:1-24
- Guimarães, V.D.; Gabriel, J.E.; Lefèvre, F.; Cabanes, D.; Gruss, A.; Cossart, P.; Azevedo, V.; Langella, P. (2005) Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes and Infection.* 7:836–844.
- Gupta, U.D.; Katoch, V.M.; McMurray, D.N. (2007) Current status of TB vaccines. *Vaccine.*; 25(19):3742-51.
- Gurunathan, S.; Wu, C.Y.; Freidag, B.L.; Seder, R.A. (2000a) DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol.* 12(4):442-7
- Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. (2000b) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Ann Rev Immunol*;18:927–74.
- Haddad, D.; Liljeqvist, S.; Ståhl, S.; Andersson, I.; Perlmann, P.; Berzins, K.; Ahlborg, N. (1997) Comparative study of DNA-based immunization vectors: effect of secretion signals on the antibody responses in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Jul;18(3):193-202.
- Hall, L..J.; Clare, S.; Pickard, D.; Clark, S.O.; Kelly, D.L.F.; Ghany, M.A..E.; Hale, C.; Dietrich, J.; Andersen, P.; Marsh, P.D.; Dougan, G. (2009) Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B–ESAT6 fusion protein. *Vaccine.* November 16; 27(49): 6894–6904.
- Hanniffy, S.B.; Carter, A.T.; Hitchin, E.; Wells, J.M. (2007) Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* 195(2):185-93.
- Harboe, M.; Oettinger, T.; Wiker, H.G.; Rosenkrands, I.; Andersen, P. (1996) Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 64, 16–22.
- Hijjar, M.A.; Gerhardt, G.; Teixeira, G.M.; Procópio, M.J. (2007) Retrospect of tuberculosis control in Brazil. *Rev Saúde Pública.* 41:1-9.
- Hoebe, K.; Janssen, E.; Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* Oct;5 (10):971-4.
- Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A. Staley, J.T.; Williams, S.T. (1994) *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Williams and Wilkins. 31:754-760.

Hu, W.S.; Pathak, V.K.; (2000) Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* 52, 493–511.

Hugenholtz, J.; Sybesma, W.; Groot, M.N.; Wisselink, W.; Ladero, V.; Burgess, K.; van Sinderen, D.; Piard, J.C.; Eggink, G.; Smid, E.J.; Savoy, G.; Sesma, F.; Jansen, T.; Hols, P.; Kleerebezem, M. (2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek* Aug; 82 (1-4):217-35.

Ingolotti, M.; Kawalekar, O.; Shedlock, D.J.; Muthumani, K.; Weiner, D.B. (2010) DNA vaccines for targeting bacterial infections. *Expert Rev Vaccines.* Jul; 9(7):747-63.

Innocentin, S.; Guimarães, V.; Myoshi, A.; Azevedo, V.; Langella, P.; Chatel, J-M; Lefèvre, F. (2009) *Lactococcus lactis* Expressing either *Staphylococcus aureus* Fibronectin-Binding Protein A or *Listeria monocytogenes* Internalin A Can Efficiently Internalize and Deliver DNA in Human Epithelial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (14): 4870-4878

Ito Y. (1960) A tumor-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cottontail rabbits. *Virology*; 12:596-601.

Izadpanah, A.; Dwinell, M.B.; Eckmann, L.; Varki, N.M.; Kagnoff, M.F. (2001) Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280:710-9.

Izzo, A.; Brandt, L.; Lasco, T.; Kipnis, A.P.; Orme, I.M. (2005) NIH pre-clinical screening program: overview and current status. *Tuberculosis*; 85:25–8.

Jana, S. and Deb, J.K. (2005) Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*; 67: 289–298.

Kagnoff, M.F. and Eckmann, L. (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest.* 100:6-10.

Kamath, A.T.; Feng, C.G.; Macdonald, M.; Briscoe, H.; Britton, W.J. (1999) Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*; 67:1702–7.

Kamath, A.T.; Rochat, A.F.; Valenti, M.P.; Agger, E.M.; Lingnau, K.; Andersen, P.; Lambert, P.H.; Siegrist, C.A. (2008) Adult-Like Anti-Mycobacterial T Cell and In Vivo Dendritic Cell Responses Following Neonatal Immunization with Ag85B-ESAT-6 in the IC31H Adjuvant. *Plus One.* 3:1-10

Kanazawa, T.; Takashima, Y.; Hirayama, S.; Okada, H. (2008) Effects of menstrual cycle on gene transfection through mouse vagina for DNA vaccine. *Int J Pharm*; 360:164-70.

Kent, S.; De Rose, R.; Rollman, E. (2007) Drug evaluation: DNA/MVA prime-boost HIV vaccine. *Curr Opin Investig Drugs*; 8:159-67.

Kim, M.S. and Sin, J.I. (2005) Both antigen optimization and lysosomal targeting are required for enhanced anti-tumour protective immunity in a human papillomavirus E7-expressing animal tumour model. *Immunology*; 116:255-66.

Kitsis, R.N.; Buttrick, P.M.; McNally, E.M.; Kaplan, M.L.; Leinwand, L.A. (1991) Hormonal modulation of a gene injected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:4138-42.

Klaenhammer, T.R.; Barrangou, R.; Buck, B.L.; Azcarate-Peril, M.A.; Altermann, E. (2005) Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* Aug;29(3):393-409.

Klinman, D.M.; Takeshita, F.; Kamstrup, S.; Takeshita, S.; Ishii, K.; Ichino, M.; Yamada, H. (2000) DNA vaccines: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Dev. Biol. (Basel)* 104, 45–51.

Kumagai, Y.; Takeuchi, O.; Akira, S. (2008) TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:795-804.

Kumar, S.; Yan, J.; Muthumani, K.; Ramanathan, M.P.; Yoon, H.; Pavlakis, G.N.; Felber, B.K.; Sidhu, M.; Boyer, J.D.; Weiner, D.B. (2006) Immunogenicity testing of a novel engineered HIV-1 envelope gp140 DNA vaccine construct. *DNA Cell Biol.* 25 (7), 383–392.

Kurth, R. (1995) Risk potential of the chromosomal insertion of foreign DNA. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 772, 140–151.

Kutzler, M.A.; Robinson, T.M.; Chattergoon, M.A.; Choo, D.K.; Choo, A.Y.; Choe, P.Y.; Ramanathan, M.P.; Parkinson, R.; Kudchodkar, S.; Tamura, Y.; Sidhu, M.; Roopchand, V.; Kim, J.J.; Pavlakis, G.N.; Felber, B.K.; Waldmann, T.A.; Boyer, J.D.; Weiner, D.B. (2005) Coimmunization with an optimized IL-15 plasmid results in enhanced function and longevity of CD8 T cells that are partially independent of CD4 T cell help. *J. Immunol.* 175 (1), 112–123.

Kutzler, M.A. and Weiner, D.B. (2008) DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*; 9:776–88.

Kwon, S.; Yoo, I.K.; Lee, W.G.; Chang, H.N.; Chang, Y.K. (2001) High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell recycle bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 73:25–34.

Lalvani, A.; Pathan, A.A.; Durkan, H.; Wilkinson, K.A.; Whelan, A.; Deeks, J.J.; Reece, W.H.; Latif, M.; Pasvol, G.; Hill, A.V. (2001) Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 357, 2017–2021.

Lamm, M.E. (1997) Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 51:311-40.

Le, T.P.; Coonan, K.M.; Hedstrom, R.C.; Charoenvit, Y.; Sedegah, M.; Epstein, J.E.; Kumar, S.; Wang, R.; Doolan, D.L.; Maguire, J.D.; Parker, S.E.; Hobart, P.; Norman, J.; Hoffman, S.L. (2000) Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine.* Mar 17;18(18):1893-901.

Lebrun, M.; Mengaud, J.; Ohayon, H.; Nato, F.; Cossart, P. (1996) Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells, *Mol. Microbiol.* 21, 579–592.

Lechardeur, D.; Sohn, K.J.; Haardt, M.; Joshi, P.B.; Monck, M.; Graham, R.W.; Beatty, B.; Squire, J.; O'Brodovich, H.; Lukacs, G.L. (1999) Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer, *Gene Ther.* 6, 482–497.

- Lecuit, M.; Vandormael-Pournin, S.; Lefort, J.; Huerre, M.; Gounon, P.; Dupuy, C.; Babinet, C.; Cossart, P. (2001) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-5.
- Ledwith, B.J.; Manam, S.; Troilo, P.J.; Barnum, A.B.; Pauley, C.J.; Griffiths, T.G. 2nd; Harper, L.B.; Beare, C.M.; Bagdon, W.J.; Nichols, W.W. (2000) Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* 43, 258–272.
- Le Loir, Y.; Nouaille, S.; Commissaire, J.; Bretigny, L.; Gruss, A.; Langella, P. (2001) Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 67, 4119-4127.
- Le Loir, Y.; Azevedo, V.; Oliveira, S.C.; Freitas, D.A.; Miyoshi, A.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Nouaille, S.; Ribeiro, L.A.; Leclercq, S.; Gabriel, J.E.; Guimaraes, V.D.; Oliveira, M.N.; Charlier, C.; Gautier, M. and Langella, P. (2005) Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* 4, 2.
- Li, Z.; Howard, A.; Kelley, C.; Delogu, G.; Collins, F.; Morris, S. (1999) Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect. Immun.* 67, 4780–4786.
- Li, J.M. and Zhu, D.Y. (2006) Therapeutic DNA vaccines against tuberculosis: a promising but arduous task. *Chin Med J (Engl)*; 119:1103-7.
- Li, K.B.; Zhang, X.G.; Ma, J.; Jia, X.J.; Wang, M.; Dong, J.; Zhang, X.M.; Xu, H.; Shu, Y.L. (2008) Codon optimization of the H5N1 influenza virus HA gene gets high expression in mammalian cells. *Bing Du Xue Bao*; 24:101-5.
- Lin, H.; Parmacek, M.S.; Morle, G.; Bolling, S.; Leiden, J.M. (1990) Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation*; 82:2217-21.
- Liu, L.; Tran, V.; Leung, A.S.; Alexander, D.C.; Zhu, B. (2009) BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines*. 5:2 70-78.
- Lori, F.; Calarota, S.A.; Lisziewicz, J. (2007) Nanochemistry-based immunotherapy for HIV-1. *Curr Med Chem*; 14:1911-9.
- Lowrie, D.B.; Silva, C.L.; Ragno, C.S.; Tascon, R.E. (1997) Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*;15 (8):834-838.
- Lugo, M.T.G.; Bewley, C.A. (2008) Natural Products, Small Molecules, and Genetics in Tuberculosis Drug Development. *J. Med. Chem.* 51:2606-2612.
- Lyashchenko, K.; Colangeli, R.; Houde, M.; Al Jahdali, H.; Menzies, D.; Gennaro, M.L. (1998a). Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 3936–3940.
- Lyashchenko, K.P.; Pollock, J.M.; Colangeli, R.; Gennaro, M.L.. (1998b) Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 5344–5349
- Macfarlane, G.T. and Cummings, J.H. (2002) Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 15:501–506

MacGregor, R.R.; Boyer, J.D.; Ugen, K.E.; Lacy, K.E.; Gluckman, S.J.; Bagarazzi, M.L.; Chattergoon, M.A.; Baine, Y.; Higgins, T.J.; Ciccarelli, R.B.; Coney, L.R.; Ginsberg, R.S.; Weiner, D.B. (1998) First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J. Infect. Dis.* 178 (1), 92–100.

MacGregor, R.R.; Boyer, J.D.; Ciccarelli, R.B.; Ginsberg, R.S.; Weiner, D.B. (2000) Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow up data. *J. Infect. Dis.* Jan; 181(1):406

Macpherson, A.J.; Hunziker, L.; McCoy, K.; Lamarre, A. (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non pathogenic microorganisms. *Microbes Infect. Rev.*;3: 1021-1035.

Mairhofer, J.; Pfaffenzeller, I.; Merz, D.; Grabherr, R. (2007) A novel antibiotic free plasmid selection system: advances in safe and efficient DNA therapy. *Biotechnol. J.* 3, 83–89.

Makarova, K.S. and Koonin, E.V. (2007) Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 189: 1199–1208.

Manam, S.; Ledwith, B.J.; Barnum, A.B.; Troilo, P.J.; Pauley, C.J.; Harper, L.B.; Griffiths, T.G. 2nd; Niu, Z.; Denisova, L.; Follmer, T.T.; Pacchione, S.J.; Wang, Z.; Beare, C.M.; Bagdon, W.J.; Nichols, W.W. (2000) Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* 43, 273–281.

Martin, C. (2005) The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Respir J.* 26:162-167.

McShane, H. (2005) Co-infection with HIV and TB: double trouble. *Int J STD AIDS* 16: 95–101.

Mercenier, A.; Muller-Alouf, H.; Grangette, C. (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2(1): 17-25.

Miller, A.M. and Dean, D.A. (2009) Tissue-specific and transcription factor-mediated nuclear entry of DNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 603–613

Mills, S.; McAuliffe, O.E.; Coffey, A.; Fitzgerald, G.F.; Ross, R.P. (2006) Plasmids of lactococci - genetic accessories or genetic necessities? *FEMS Microbiol Rev* 30(2):243-73.

Mincheff, M.; Tchakarov, S.; Zoubak, S.; Loukinov, D.; Botev, C.; Altankova, I.; Georgiev, G.; Petrov, S.; Meryman, H.T. (2000) Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a Phase I/II clinical trial. *Eur. Urol.* Aug;38(2):208-17.

Miyoshi, A.; Jamet, E.; Commissaire, J.; Renault, P.; Langella, P.; Azevedo, V. (2004) A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol Lett.* 239(2):205-12.

Moore, A.C. and Hill, A.V. (2004) Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev*; 199:126-43.

- Moorthy, V.S.; Pinder, M.; Reece, W.H.; Watkins, K.; Atabani, S.; Hannan, C.; Bojang, K.; McAdam, K.P.; Schneider, J.; Gilbert, S.; Hill, A.V. (2003) Safety and immunogenicity of DNA/modified vaccinia virus Ankara malaria vaccination in African adults. *J. Infect. Dis.* 188, 1239–1244.
- Morello, E.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Llull, D.; Solé, V.; Miraglio, N.; Langella, P.; Poquet, I. (2008) *Lactococcus lactis*, an Efficient Cell Factory for Recombinant Protein Production and Secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol*;14:48–58.
- Muthumani, K.; Lankaraman, K.M.; Laddy, D.J.; Sundaram, S.G.; Chung, C.W.; Sako, E.; Wu, L.; Khan, A.; Sardesai, N.; Kim, J.J.; Vijayachari, P.; Weiner, D.B. (2008) Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*; 26:5128-34.
- Neutra, M.R. and Kozlowski, P.A. (2006) Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 6:148-58.
- Norton, P.M.; Le Page, R.W.; Wells, J.M. (1995) Progress in the development of *Lactococcus lactis* as a recombinant mucosal vaccine delivery system. *Folia Microbiol.* 40(3):225-30.
- Nouaille S.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Pontes, D.; Le Loir, Y.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V. (2003) Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res.* 31;2(1):102-11.
- Ogura, M.; Paliwal, S.; Mitragotri, S. (2008) Low-frequency sonophoresis: current status and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:1218-23.
- O'Hagan, D.T.; Singh, M.; Ulmer, J. B. (2006) Microparticle-based technologies for vaccines. *Methods* 40, 10–19.
- Olsen, A.W.; Williams, A.; Okets, I.M.; Hatch, G.; Andersen, A. (2004) Protective effect of a subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT- 6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun.* 72:6146–50
- Olsen, A.W.; Van Pinxteren, L.A.H.; Okkels, L.M.; Peter Birk Rasmussen, P.B.; Andersen, P. (2001) Protection of Mice with a Tuberculosis Subunit Vaccine Based on a Fusion Protein of Antigen 85B and ESAT-6. *Infection and Immunity*, May, p. 2773–2778.
- Orme, I.M. (2005) Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis*; 85(1–2):13–7.
- Paglia, P.; Medina, E.; Arioli, I.; Guzman, C.A.; Colombo, M.P. (1998) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 92, 3172–3176.
- Pal, R.; Yu, Q.; Wang, S.; Kalyanaraman, V.S.; Nair, B.C.; Hudacik, L.; Whitney, S.; Keen, T.; Hung, C.L.; Hocker, L.; Kennedy, J.S.; Markham, P.; Lu, S. (2006) Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. *Vaccine.* Feb 20;24(8):1225-34.
- Pan, Z.; Zhang, X.; Geng, S.; Cheng, N.; Sun, L.; Liu, B.; Huang, J.; Jiao, X. (2009) Priming with a DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* and boosting with a killed vaccine confers protection of chickens against infection with the H9 subtype of avian influenza virus. *Vaccine*; 27:1018-23.

- Patterson, L.J.; Robert-Guroff, M. (2008) Replicating adenovirus vector prime/protein boost strategies for HIV vaccine development. *Expert Opin Biol Ther*; 8:1347-63.
- Peek, L.J.; Middaugh, C.R.; Berkland, C. (2008) Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*; 60:915-28.
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R. (2007) The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, Vol.15 No.12.
- Pfyffer, G.E.; Auckenthaler, R.; Embden, J.D.A.; Soolingen, D. (1998) *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. *Emerg Infect Dis*. 4(4): 631-4.
- Piard, J.C.; Hautefort, I.; Fischetti, V.A.; Ehrlich, S.D.; Fons, M. and Gruss A. (1997) Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 179, 3068-3072.
- Pieters, J. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. *Cell & Microbe Review*. 3:399-407.
- Pollock, J.M. and Andersen, P. (1997) Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of infection with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect. Immun*. 65, 2587–2592.
- Pontes, D.S.; Dorella, F.A.; Ribeiro, L.A.; Miyoshi, A.; Le Loir, Y.; Gruss, A.; Oliveira, S.C.; Langella, P.; Azevedo, V. (2003) Induction of partial protection in mice after oral administration of *Lactococcus lactis* producing *Brucella abortus* L7/L12 antigen. *J Drug Target*.; 11(8-10):489-93.
- Poquet, I.; Ehrlich, S.D.; Gruss, A. (1998) An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 180:1904-1912.
- Porgador, A.; Irvine, K.R.; Iwasaki, A.; Barber, B.H.; Restifo, N.P.; Germain, R.N. (1998) Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med*. Sep 21;188(6):1075-82.
- Pym, A.S.; Brodin, P.; Brosch, R.; Huerre, M.; Cole, S.T. (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 46: 709–717.
- Que, Y. A.; Francois, P.; Haefliger, J. A.; Entenza, J. M.; Vaudaux, P.; Moreillon, P. (2001) Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infect Immun* 69:6296-302.
- Ravn, P.; Demissie, A.; Eguale, T.; Wondwosson, H.; Lein, D.; Amoudy, H.A.; Mustafa, A.S.; Jensen, A.K.; Holm, A.; Rosenkrands, I.; Oftung, F.; Olobo, J.; von Reyn, F.; Andersen, P. (1999) Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis*. 179, 637–645
- Ravn, P.; Arnau, J.; Madsen, S.M.; Vrang, A.; Israelsen, H. (2000) The development of TnNuc and its use for the isolation of novel secretion signals in *Lactococcus lactis*. *Gene*, 242:347-356.
- Reed, S. and Lobet, Y. (2005) Tuberculosis Vaccine Development: From Mouse To Man. *Microbes And Infect*. 7:922-931.

Reid, G.; Jass, J.; Sebulsky, M.T.; McCormick, J.K. (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16: 658–672.

Renshaw, P.S.; Panagiotidou, P.; Whelan, A.; Gordon, S.V.; Hewinson, R.G.; Williamson, R.A.; Carr, M.D. (2002) Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *M. tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterisation of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT-6-CFP-10 complex: implications for pathogenesis and virulence. *J. Biol. Chem.* 277(24), 21598–21603.

Rescigno, M.; Rotta, G.; Valzasina, B.; Ricciardi-Castagnoli, P. (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204, 572–581.

Reyes-Sandoval, A. and Ertl, H.C. (2001) DNA vaccines. *Curr Mol Med*; 1:217-43.

Robinson, K.; Chamberlain, L.M.; Schofield, K.M.; Wells, J.M.; Le Page, R.W. (1997) Oral Vaccination Of Mice Against Tetanus Using Recombinant *Lactococcus Lactis*. *Nature Biotechnology*. 15: 653-657

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y

Sanders, M.E. (2003) Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* Mar; 61(3):91-9. Review.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74:5463-5467.

Scavone, P.; Miyoshi, A.; Rial, A.; Chabalgoity, A.; Langella, P.; Azevedo, V.; Zunino, P. (2007) Intranasal immunisation with recombinant *Lactococcus lactis* displaying either anchored or secreted forms of *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonisation in mice. *Microbes Infect.*; 9(7):821-8.

Schaffner, W. (1980) Direct transfer of cloned genes from bacteria to mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2163–2167.

Schroeter, J. and Klaenhammer, T. (2009) Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 292,1–6.

Schleifer, K.H.; Kraus, J.; Dvorak, C.; Kilpper-Bälz, R.; Collins, M.D.; Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 6: 183–195.

Schoen, C.; Stritzker, J.; Goebel, W.; Pilgrim S. (2004) Bacteria as DNA vaccine carriers for genetic immunization. *Int J Med Microbiol.* 294: 319-335.

Sheets, R.L.; Stein, J.; Manetz, T.S.; Duffy, C.; Nason, M.; Andrews, C.; Kong, W.P.; Nabel, G.J.; Gomez, P.L. (2006) Biodistribution of DNA plasmid vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile virus is similar, without integration, despite differing plasmid backbones or gene inserts. *Toxicol. Sci.* Jun; 91(2), 610–619.

Seleem, M.N.; Jain, N.; Alqublan, H.; Vemulapalli, R.; Boyle, S.M.; Sriranganathan, N. (2008) Activity of native vs. synthetic promoters in *Brucella*. *FEMS Microbiol Lett*; 288:211-5.

- Sheikh, N.A. and Morrow, W.J. (2003) Guns, genes, and spleen: a coming of age for rational vaccine design. *Methods* 31, 183–192.
- Shepherd, C.T. and Scott, M.P. (2008) Construction and evaluation of a maize chimeric promoter with activity in kernel endosperm and embryo. *Biotechnol Appl Biochem*.
- Silva, C.L. (1999) The Potencial use of Heat-Shock Proteins to Vaccinate Against Mycobacterial Infections. *Microbes And Infection*. 1:429-435
- Sinha, B.; Francois, P.; Que, Y. A.; Hussain, M.; Heilmann, C.; Moreillon, P.; Lew, D.; Krause, K.H.; Peters, G.; Herrmann, M. (2000) Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* 68:6871-8.
- Sizemore, D.R.; Branstrom, A.A.; Sadoff, J.C. (1995) Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 270, 299–302.
- Somia, N. and Verma, I.M. (2000) Gene therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* 1, 91–99.
- Sorensen, A.L.; Nagai, S.; Houen, G.; Andersen, P. (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63, 1710–1717.
- Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L.; Neiryneck, S.; Obermeier, F.; Falk, W.; Fiers, W.; Remaut, E. (2000) Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 289: 1352–1355.
- Sterne, J.A.; Rodrigues, L.C.; Guedes, I.N. (1998) Does the efficacy of BCG decline with time since vaccination? *Int J Tuberc Lung Dis*; 2 (March (3)):200–7.
- Stewart, A.J. and Devlin, P.M. (2006) The history of the smallpox vaccine. *J Infect*; 52:329-34.
- Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70:331–345.
- Tacket, C. O. et al. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 17, 2826–2829 (1999).
- Taguchi, S.; Yamada, M.; Matsumoto, K.; Tajima, K.; Satoh, Y.; Munekata, M.; Ohno, K.; Kohda, K.; Shimamura, T.; Kambe, H.; Obata, S. (2008) A microbial factory for lactate-based polyesters using a lactate-polymerizing enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* Nov 11;105(45): 17323–17327
- Tang, D.C.; DeVit, M.; Johnston, S.A. (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152–154.
- Taranto, M.P.; Vera, J.L.; Hugenholtz, J.; De Valdez, G.F.; Sesma, F. (2003) *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J Bacteriol* 185:5643–5647.
- Temin, H.M. (1990) Overview of biological effects of addition of DNA molecules to cells. *J. Med. Virol.* 31, 13–17.

- Tezel, A.; Paliwal, S.; Shen, Z.; Mitragotri, S. (2005) Low-frequency ultrasound as a transcutaneous immunization adjuvant. *Vaccine* 23, 3800–3807.
- Tokuoka, M.; Tanaka, M.; Ono, K.; Takagi, S.; Shintani, T.; Gomi, K. (2008) Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Appl Environ Microbiol*; 74:6538-46.
- Trunz, B.B.; Fine, P.; Dye, C. (2006) Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and military tuberculosis worldwide: a meta analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet.*, Apr 8;367(9517):1173-80.
- Ulmer, J.B.; Donnelly, J.J.; Parker, S.E.; Rhodes, G.H.; Felgner, P.L.; Dwarki, V.J.; Gromkowski, S.H.; Deck, R.R.; DeWitt, C.M.; Friedman, A. (1993) Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* Mar 19;259(5102), 1745–1749.
- Ulmer, J.B.; Wahren, B.; Liu, M.A. (2006) Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends Mol. Med.* 12, 216–222.
- Urbach, G. (1995) Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int Dairy J* 5:877–903.
- Van Asseldonk, M.; Rutten, G.; Oteman, M.; Siezen, R.J.; De Vos, W.M.; Simons, G. (1990) Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95, 155-160.
- Van Damme, P.; Oosterhuis-Kafeja, F.; Van der Wielen, M.; Almagor, Y.; Sharon, O.; Levin, Y. (2009) Safety and efficacy of a novel microneedle device for dose sparing intradermal influenza vaccination in healthy adults. *Vaccine*; 27:454-9.
- Vanniasinkam, T.; Reddy, S.T.; Ertl, H.C. (2006) DNA immunization using a non-viral promoter. *Virology*; 344:412-20.
- Vaughan, E. E. e Dean, D.A. Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules, *Mol. Ther.* 13 (2006) 422–428.
- Xiang, Z.Q.; Spitalnik, S.; Tran, M.; Wunner, W.H.; Cheng, J.; Ertl, H.C. (1994) Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*; 199:132-40.
- Xu, Z.L.; Mizuguchi, H.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Mayumi, T.; Hayakawa, T. (2001) Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene* 272, 149–156.
- Xu, Z.L.; Mizuguchi, H.; Ishii-Watabe, A.; Uchida, E.; Mayumi, T.; Hayakawa, T. (2002) Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J Control Release*; 81:155-63.
- Xu, J.; Ding, Y.; Yang, Y. (2008) Enhancement of mucosal and cellular immune response in mice by vaccination with respiratory syncytial virus DNA encapsulated with transfersome. *Viral Immunol*; 21:483-9.
- Xu, J.; Xu, W.; Chen, X.; Zhao, D.; Wang, Y. (2008) Recombinant DNA vaccine of the early secreted antigen ESAT-6 by *Mycobacterium tuberculosis* and Flt3 ligand enhanced the cell-mediated immunity in mice. *Vaccine* 26, 4519–4525

- Xu, Y.; Liu, W.; Shen, H.; Yan, J.; Qu, D.; Wang, H. (2009) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the chimeric protein of antigen 85B and ESAT-6 enhances the Th1 cell-mediated response. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1121-1126
- Xu, Y.; Liu, W.; Shen, H.; Yan, J.; Yang, E.; Wang, H. (2010) Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing chimaeric protein of Ag85B and ESAT-6 enhances immunostimulatory activity of human macrophages. *Microbes and Infection* 12, 683-689
- Yang, J.S.; Ramanathan, M.P.; Muthumani, K.; Choo, A.Y.; Jin, S.H.; Yu, Q.C.; Hwang, D.S.; Choo, D.K.; Lee, M.D.; Dang, K.; Tang, W.; Kim, J.J.; Weiner, D.B. (2002) Induction of inflammation by West Nile virus capsid through the caspase-9 apoptotic pathway. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 1379-1384.
- Yu, Y.A.; Shabahang, S.; Timiryasova, T.M.; Zhang, Q.; Beltz, R.; Gentshev, I.; Goebel, W.; Szalay, A.A. (2004). Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat. Biotechnol.* 22, 313-320.
- Walker, R.I. (1994) New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine* 12, 387-400.
- Wang, B.; Ugen, K.E.; Srikantan, V.; Agadjanyan, M.G.; Dang, K.; Refaeli, Y.; Sato, A.I.; Boyer, J.; Williams, W.V.; Weiner, D.B. (1993) Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:4156-60.
- Wang, Q.M.; Sun, S.H.; Hu, Z.L.; Yin, M.; Xiao, C.J.; Zhang, J.C. (2004) Improved immunogenicity of a tuberculosis DNA vaccine encoding ESAT6 by DNA priming and protein boosting. *Vaccine* 22, 3622-3627
- Wang, S.; Farfan-Arribas, D.J.; Shen, S.; Chou, T.H.; Hirsch, A.; He, F.; Lu, S. (2006a) Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine* 24, 4531-4540.
- Wang, X.Y.; Bao, L.; Zhao, M.C.; Zhang, H.D.; Long, Y. (2006b) Expression of the fusion protein CFP10-ESAT6 of *Mycobacterium tuberculosis* and the study of its immunogenicity. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* May;37(3):353-6.
- Wang, Q.L.; Pan, Q.; Ma, Y.; Wang, K.; Sun, P.; Liu, S.; Zhang, X.L. (2009) An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis* *Vaccine* 27, 6712-6722
- Watabe, S.; Xin, K-Q.; Ihata, A.; Liu, L-J.; Honsho, A.; Aoki, I.; Hamajima, K.; Wahren, B.; Okuda, K. (2001) Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine*; 19:4434-44.
- Wells, J.M.; Wilson, P.W.; Norton, P.M.; Le Page, R.W. (1993a) A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3954-3959.
- Wells, J. M.; Wilson, P. W.; Norton, P. M.; Gasson, M. J.; Le Page, R. W. (1993b). *Lactococcus Lactis*: High-Level Expression Of Tetanus Toxin Fragment C And Protection Against Lethal Challenge. *Mol. Microbiol.* 8:1155-1162.

- Wells, J.M. and Mercenier, A. (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature*. 1038:1-14.
- Welman, A.D.; Maddox, I.S. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* 21:269–274
- Whitehead, K.; Mitragotri, S. (2008) Mechanistic analysis of chemical permeation enhancers for oral drug delivery. *Pharm Res*; 25:1412-9.
- Williams, J.A.; Carnes, A.E.; Hodgson, C.P. (2009) Plasmid DNA Vaccine vector design: impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnol Adv.*; 27(4): 353–370. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.02.003.
- Wilson, G.L.; Dean, B.S.; Wang, G.; Dean, D.A. (1999) Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences, *J. Biol. Chem.* 274, 22025–22032.
- Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465–1468.
- WHO (World Health Organization). (2000) World Health Report. Health Systems: improving performance.; Geneva, Switzerland.
- WHO (World Health Organization). (2005) Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing. WHO, Geneva, Switzerland.
- WHO (World Health Organization). (2006) Global tuberculosis control: surveillance, planning and financing. Geneva, Switzerland: WHO; Publication WHO/HTM/TB/2006.362.
- Zaharoff, D.A.; Barr, R.C.; Li, C.Y.; Yuan, F. (2002) Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.*; 9:1286-90.
- Zhang, Y. (2005). The Magic Bullets And Tuberculosis Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45:529-64
- Zhu, Y.; Zhang, Y.; Li, Y. (2009) Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009 Jun;83(4):597-610. Epub, May 23.